



**Tiago Filipe do Carmo Nunes**

Licenciado em Química Aplicada – Perfil de Biotecnologia

**Caracterização da NADH-menaquinona  
oxidorreductase do tipo II de *M. tuberculosis*: um  
novo alvo terapêutico no combate à  
tuberculose?**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Bioquímica

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana M. P. Melo, Investigadora Auxiliar  
Convidada, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa

Co-orientador: Prof. Doutor Carlos A. Salgueiro, Professor  
Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de  
Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares  
Arguente: Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria Alice Santos Pereira  
Vogal: Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Margarida Nunes Portugal Carvalho Melo



**Universidade Nova de Lisboa**

**Tiago Filipe do Carmo Nunes**

Licenciado em Química Aplicada – Perfil de Biotecnologia

**Caracterização da NADH-menaquinona oxidoredutase do tipo II de *M. tuberculosis*: um novo alvo terapêutico no combate à tuberculose?**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Bioquímica

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana M. P. Melo, Investigadora Auxiliar Convidada,  
Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa

Co-orientador: Prof. Doutor Carlos A. Salgueiro, Professor Auxiliar, Faculdade de  
Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa



**Outubro 2015**



# **Caracterização da NADH-menaquinona oxidoredutase do tipo II de *M. tuberculosis*: um novo alvo terapêutico no combate à tuberculose?**

## **“Copyright”**

Tiago Filipe do Carmo Nunes  
Faculdade de Ciências e Tecnologia  
Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.









## Agradecimentos

Em primeiro lugar, aos meus orientadores, Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Melo e Prof. Doutor Carlos Salgueiro, pela oportunidade de integrar este projeto.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Melo, pelo apoio prestado, pela disponibilidade, pela preocupação. Muito obrigado por tudo!

Ao meu Co-orientador, Prof. Doutor Carlos Salgueiro, um agradecimento especial pelo apoio e dedicação incansável durante a realização de todo este trabalho. Obrigado pela motivação e generosidade. Muito obrigado por tudo!

À Prof.<sup>a</sup> Doutora Isabel Couto pela simpatia, pela disponibilidade para me receber e por todos os ensinamentos transmitidos durante a temporada deste projeto passada no IHMT.

Às colegas do laboratório da UEI de Micobactérias do IHMT, Diana e Sofia Costa, pela disponibilidade, paciência e ajuda. À Elizeth, Marta e Sofia Simões, por todos os momentos partilhados, pelos momentos de descontração e pelos almoços bastante animados.

Às colegas do laboratório 611, Joana, Marta, Telma Simões, Telma Santos e Marisa, pela boa disposição, ajuda, e companheirismo. Um obrigado especial à Ana Fernandes, pela partilha de conhecimento, pelos ensinamentos, pela paciência, pelos concelhos, dicas, e pela companhia nas nossas noites de ensaios cinéticos! Muito obrigado!

Às minhas colegas do Mestrado em Bioquímica nomeadamente, Elisabeth, Cátia, Ana Inês e Raquel, pelo companheirismo durante os momentos mais difíceis, bem como a boa disposição sempre presente nas nossas conversas!

À Catarina, Sónia, Susana, Cláudia e Daniela, por tudo! Não tenho palavras descrever o quanto me ajudaram. À Cláudia, um especial e enorme obrigado, pela amizade duradoura, por me ouvir, pelos conselhos, por simplesmente estar sempre disponível para me ajudar!

Por fim, mas o mais especial. A toda a minha família que sempre me apoiou nas minhas decisões e sempre me amparou nos momentos mais difíceis. Um obrigado especial à minha tia Isabel Gonçalves, de quem muitas vezes uma palavra bastava para me tranquilizar. Aos meus pais, a quem especialmente e com todo o gosto do mundo dedico este trabalho, por tornarem este sonho realidade, por todo o apoio, pela dedicação, paciência e por nunca me deixarem desistir. Um obrigado de coração!



## Resumo

A tuberculose pulmonar (TB) causa cerca de 2 milhões de mortes por ano, estimando-se ainda que um terço da população mundial esteja infectado por *Mycobacterium tuberculosis*. O tratamento da TB é moroso e exigente, levando muitas vezes ao seu abandono, resultando no aparecimento de estipes multirresistentes (MDR-TB) ou extensivamente resistentes (XDR-TB) aos fármacos utilizados. Estudos recentes identificaram a NADH-menaquinona oxidoredutase do tipo II (NDH-2) de *M. tuberculosis* como uma enzima-chave da cadeia respiratória deste organismo. A NDH-2 não tem homólogos na mitocôndria humana, o que a torna um excelente alvo para novos fármacos anti-TB.

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização da NDH-2 como possível alvo terapêutico. Para tal, foram realizados ensaios de atividade enzimática da NDH-2, em ambiente membranar, na presença de compostos com atividade antimicobacteriana, nomeadamente, clofazimina (CFZ), flupentixol (FPX), tioridazina (TZ), verapamil (VP), PR e U4. Este estudo permitiu determinar os valores de concentração de composto que inibem 50% da atividade da enzima ( $IC_{50}$ ). Foi ainda realizado um estudo cinético mais detalhado para o PR com o objetivo de determinar os parâmetros cinéticos  $V_{max}$  e  $K_M$ .

Os resultados obtidos mostraram que todos os compostos utilizados inibem a atividade da NDH-2, apresentando os seguintes valores de  $IC_{50}$ : PR (1,4  $\mu M$ ), CFZ (1,9  $\mu M$ ), FPX (2,8  $\mu M$ ), TZ (8,1  $\mu M$ ), U4 (46,5  $\mu M$ ) e VP (91,8  $\mu M$ ). Assim sendo, os três primeiros compostos parecem mais promissores na terapêutica antimicobacteriana.

Relativamente ao estudo cinético efetuado para o substrato NADH foi possível determinar o valor de  $V_{max}$  (1,3  $\mu mol\ min^{-1}$ ) e  $K_M$  (61,9  $\mu M$ ) para a NDH-2 em ambiente membranar, na ausência de inibidor.

**Palavras-chave:** Tuberculose; *Mycobacterium tuberculosis*; NADH-menaquinona oxidoredutase do tipo II; alvo terapêutico; atividade enzimática.



## Abstract

Pulmonary tuberculosis (TB) causes approximately 2 million deaths per year and it is estimated that a third of the world's population is infected by *Mycobacterium tuberculosis*. TB treatment is long and demanding which could lead to multidrug-resistant (MDR-TB) and extensively-drug resistant (XDR-TB) strains. Recent studies have identified the type II NADH:menaquinone oxidoreductase (NDH-2) of *M. tuberculosis* as a key enzyme of the respiratory chain of this organism. The NDH-2 does not have counterparts in human mitochondria, which makes it an excellent target for new anti-TB drugs.

This study aimed to characterize NDH-2 as a possible therapeutic target. To do so, enzymatic activity assays of NDH-2 were performed, in membrane environment, in the presence of compounds with antimycobacterial activity, in particular, clofazimine (CFZ), flupentixol (FPX), thioridazine (TZ), verapamil (VP), PR and U4. This study allowed us to determine the concentration of compound which inhibits 50% of enzyme activity ( $IC_{50}$ ). It was also conducted a more detailed kinetic study for PR in order to determine the kinetic parameters  $V_{max}$  and  $K_M$ .

The results showed that all compounds used inhibit the activity of NDH-2, with the following  $IC_{50}$  values: PR (1.4  $\mu M$ ), CFZ (1.9  $\mu M$ ), FPX (2.8  $\mu M$ ), TZ (8.1  $\mu M$ ), U4 (46.5  $\mu M$ ) e VP (91.8  $\mu M$ ). Hence, the first three compounds seem more promising in the treatment of TB.

Regarding the kinetic study in presence of the PR, it was possible to determine the value of  $V_{max}$  (1.3  $\mu mol\ min^{-1}$ ) and  $K_M$  (61.9  $\mu M$ ) for NDH-2 in the membrane environment and in the absence of inhibitor.

**Keywords:** Tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis*; type II NADH:menaquinone oxidoreductase; therapeutic target; enzymatic activity.



# Índice

Agradecimentos .....	vii
Resumo.....	ix
Abstract .....	xi
Índice de Figuras .....	xvi
Índice de Tabelas.....	xviii
Abreviaturas.....	xx
Capítulo 1 – Introdução.....	1
1.1. Tuberculose .....	1
1.1.1. Tuberculose latente e tuberculose ativa.....	1
1.1.2. Sintomatologia e transmissão .....	1
1.1.3. Emergência de estirpes resistentes a fármacos .....	2
1.1.4. Epidemiologia .....	2
1.1.5. Género <i>Mycobacterium</i> .....	4
1.1.5.1. Características gerais do género <i>Mycobacterium</i> .....	4
1.1.5.2. Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	5
1.1.5.2.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	5
1.1.6. Resistência a compostos antimicrobianos .....	6
1.1.7. Tratamento de Tuberculose .....	6
1.1.8. Novos alvos terapêuticos .....	7
1.2. Cadeia Respiratória de <i>M. tuberculosis</i> .....	7
1.2.1. NADH-menaquinona oxidoredutase do tipo II (NDH-2) .....	9
1.2.2. Compostos com atividade antimicobacteriana utilizados no estudo da NDH-2 de <i>M. tuberculosis</i> .....	11
1.2.2.1. Tioridazina.....	11
1.2.2.2. Flupentixol.....	12
1.2.2.3. Clofazimina.....	12
1.2.2.4. Verapamil.....	13
1.3. Objetivos .....	14

<b>Capítulo 2 – Materiais e Métodos.....</b>	<b>15</b>
2.1. Meios de cultura, reagentes e soluções .....	15
2.2. Equipamentos .....	16
2.3. Procedimentos Experimentais .....	16
2.3.1. Expressão heteróloga da proteína NDH-2 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em <i>Mycobacterium smegmatis</i> e isolamento da fração membrana .....	16
2.3.2. Monitorização do isolamento da fração membrana por eletroforese SDS-PAGE.....	18
2.4. Ensaio de atividade enzimática da proteína NDH-2 de <i>M. tuberculosis</i> em ambiente membrana, na presença de compostos com atividade antimicrobiana. ....	19
2.4.1. Otimização das condições dos ensaios de atividade enzimática .....	19
2.4.2. Estudos cinéticos .....	21
2.5. Tratamento de resultados.....	21
2.5.1. Cálculo da atividade específica da proteína NDH-2 de <i>M. tuberculosis</i> presente nas frações membranares .....	21
2.5.2. Determinação do efeito inibitório da NDH-2 por compostos com atividade antimicrobiana .....	23
2.5.2.1. Determinação dos valores de concentração inibitória (IC <sub>50</sub> ) .....	23
2.5.2.2. Determinação dos parâmetros cinéticos da NDH-2 na presença e ausência de PR.....	23
<b>Capítulo 3 – Resultados e Discussão.....</b>	<b>27</b>
3.1. Monitorização do isolamento da fração membrana por eletroforese SDS-PAGE.....	27
3.2. Ensaio de atividade enzimática da NDH-2 de <i>M. tuberculosis</i> em ambiente membrana, na presença de compostos com atividade antimicrobiana .....	28
3.2.1. Otimização das condições dos ensaios de atividade enzimática .....	28
3.2.1.1. Seleção da estirpe a utilizar nos ensaios de determinação da atividade específica da NDH-2 .....	29
3.2.1.2. Otimização da concentração de membranas Msm pT2.....	30
3.2.1.3. Seleção da quinona: menaquinona versus ubiquinona .....	31
3.2.1.4. Otimização da concentração do inibidor KCN .....	32
3.2.1.5. Otimização da concentração do inibidor do complexo I (rotenona) .....	33



3.2.1.6.	Ordem de adição dos compostos nos ensaios cinéticos .....	35
3.2.2.	Determinação do efeito inibitório da NDH-2 por compostos com atividade antimicobacteriana .....	36
3.2.2.1.	Determinação dos valores de concentração inibitória (IC <sub>50</sub> ) .....	36
3.2.2.2.	Determinação dos parâmetros cinéticos da NDH-2 na presença e ausência de PR .....	37
Capítulo 4 – Conclusões e Perspetivas Futuras .....		43
Bibliografia .....		45
Anexos .....		51
Anexo 1 .....		51

## Índice de Figuras

Figura 1.1 – Distribuição geográfica das taxas de mortalidade por tuberculose estimadas em 2013, excluindo mortes por tuberculose de pessoas HIV-positivas.....	2
Figura 1.2 – Distribuição geográfica mundial do número estimado de casos de tuberculose multirresistente, em 2013 .....	3
Figura 1.3 – Distribuição geográfica do número de indivíduos aos quais foi confirmado laboratorialmente tuberculose extensivamente resistente até ao final do ano 2013. ....	3
Figura 1.4 – Representação esquemática da parede celular das espécies do género <i>Mycobacterium</i> . ....	4
Figura 1.5 – Representação esquemática da cadeia respiratória de micobactérias. ....	8
Figura 1.6 – Os dois motivos GXGXXG da proteína NDH-2 de <i>M. tuberculosis</i> potencialmente responsáveis pela ligação de NADH e FAD, respetivamente.....	9
Figura 1.7 – Mecanismo de <i>ping-pong</i> para uma reação enzimática. ....	10
Figura 1.8 – Mecanismo de complexo ternário para uma reação enzimática .....	10
Figura 1.9 – Representação da estrutura e locais de ligação dos substratos NADH e menaquinona na estrutura da NDH-2 de <i>Caldalkalibacillus thermarum</i> . ....	11
Figura 1.10 – Estrutura da Tioridazina. ....	12
Figura 1.11 – Estrutura do Flupentixol. ....	12
Figura 1.12 – Estrutura da Clofazimina. ....	13
Figura 1.13 – Estrutura do Verapamil. ....	13
Figura 2.1 – Representação esquemática do processo de crescimento de <i>M. smegmatis</i> wt e pT2 e indução da expressão da proteína NDH-2. ....	17
Figura 2.2 – Representação esquemática do processo de isolamento das frações membranares de <i>M. smegmatis</i> . ....	18
Figura 2.3 – Representação esquemática do procedimento utilizado nos ensaios de atividade enzimática da proteína NDH-2 em ambiente membranar.....	20
Figura 2.4 – Curva de evolução temporal do ensaio cinético da proteína NDH-2 de <i>M. tuberculosis</i> em ambiente membranar. ....	22

Figura 2.5 – Representação gráfica da regressão não-linear log [inibidor] vs. Resposta .....	23
Figura 2.6 – Representação gráfica da curva típica de Michaelis-Menten .....	24
Figura 2.7 – Linearizações derivadas de equação de Michaelis-Menten.. .....	25
Figura 3.1 – Exemplo dos géis obtidos após eletroforese SDS-PAGE .....	27
Figura 3.2 – Frações membranares das estirpes wt e pT2 de <i>M. smegmatis</i> . .....	28
Figura 3.3 – Espectros UV-Vis das frações membranares wt e pT2 .....	28
Figura 3.4 – Ensaio de atividade onde a cadeia respiratória não se encontrava inibida. ....	29
Figura 3.5 – Atividade específica da NDH-2 presente nas estirpes Msm wt e pT2. ....	30
Figura 3.6 – Curvas de evolução temporal dos ensaios de determinação de atividade da NDH-2 para diferentes concentrações de membranas de Msm pT2 (5, 10 e 20 µg/mL). ....	31
Figura 3.7 – Atividade específica da NDH-2 de <i>M. tuberculosis</i> na presença de 100 µM de MenaQ e Q1. ....	32
Figura 3.8 – Variação da atividade específica da NDH-2 de <i>M. tuberculosis</i> na presença de diferentes concentrações de KCN. ....	33
Figura 3.9 – Variação da atividade específica da NDH-2 de <i>M. tuberculosis</i> na presença de diferentes concentrações de rotenona (rot). ....	34
Figura 3.10 – Exemplo de um ensaio completo (variação da absorvância a 340 nm em função do tempo) a partir do qual é determinada a atividade da NDH-2 de <i>M. tuberculosis</i> . ....	35
Figura 3.11 – Valores de IC <sub>50</sub> (µM) dos compostos com atividade antimicobacteriana estudados .....	36
Figura 3.12 – Variação da atividade da NDH-2 com a concentração do substrato NADH para diferentes concentrações de PR. ....	37
Figura 3.13 – Representações de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf, Dixon e Cornish-Bowden.....	38
Figura 3.14 – Variação da atividade da NDH-2 com a concentração do substrato NADH para diferentes concentrações de PR, não considerando os pontos anómalos .....	39
Figura 3.15 – Representações de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf, Dixon e Cornish-Bowden, não considerando os pontos anómalos .....	40

## Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Membros do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	5
Tabela 2.1 – Composição do meio de cultura para crescimento das estirpes de <i>M. smegmatis</i> .....	15
Tabela 2.2 – Reagentes e soluções.....	15
Tabela 2.3 – Compostos com atividade antimicobacteriana.....	16
Tabela 2.4 – Equipamentos utilizados. ....	16
Tabela 2.5 – Composição do tampão de aplicação para eletroforese SDS-PAGE.....	18
Tabela 3.1 – Valores de atividade específica da NDH-2 presente nas estirpes Msm wt e pT2 e respectivos desvios padrão. ....	30
Tabela 3.2 – Comparação dos valores de atividade específica obtidos na ausência e presença dos inibidores dos complexos da cadeia respiratória. ....	34
Tabela 3.3 – Valores de $V_{\max}$ e $K_M$ para a NDH-2 em ambiente membranar. ....	41
Tabela A1 – Classificação do tipo de inibição através do perfil das linearizações de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee e Hanes-Woolf.....	51
Tabela A2 – Classificação do tipo de inibição através do perfil dos gráficos de Dixon e Cornish-Bowden.....	52



## Abreviaturas

BCA	Ácido bicinconínico
CFZ	Clofazimina
DO	Densidade ótica
FPX	Flupentixol
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50%, do inglês <i>half maximal inhibitory concentration</i>
K <sub>i</sub>	Constante de inibição
K <sub>M</sub>	Constante de Michaelis
MDR-TB	Tuberculose multirresistente a fármacos, do inglês <i>multidrug-resistant tuberculosis</i>
MenaQ	Menaquinona
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanossulfónico
Msm pT2	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155:pMind: <i>ndh-2</i>
Msm wt	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155
MTC	Complexo <i>M. tuberculosis</i> , do inglês <i>M. tuberculosis Complex</i>
NDH-1	NADH desidrogenase do tipo I
NDH-2	NADH desidrogenase do tipo II ou NADH-menaquinona oxidorreductase
Q1	Ubiquinona-1 ou Coenzima Q1
Rot	Rotenona
TB	Tuberculose
TZ	Tioridazina
V <sub>max</sub>	Velocidade máxima
VP	Verapamil
XDR-TB	Tuberculose extensivamente resistente a fármacos, do inglês <i>extensively drug-resistant tuberculosis</i>



# Capítulo 1 – Introdução

## 1.1. Tuberculose

A Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa, em muitos casos fatal, causada por *Mycobacterium tuberculosis* [1]. A forma pulmonar da tuberculose é a mais frequente e generalizada da doença. Porém, o bacilo pode afetar também outros órgãos do nosso organismo, dando origem, entre outras, a tuberculose linfática, pleural, geniturinária, osteoarticular ou miliar [2,3].

Se um indivíduo for infectado com o bacilo da tuberculose este pode ou não desenvolver a doença, isto é, pode ocorrer um estado ativo (TB ativa) ou latente (TB latente) da doença [4].

### 1.1.1. Tuberculose latente e tuberculose ativa

A TB latente ocorre quando o *M. tuberculosis* está presente no organismo de um indivíduo em baixa concentração e é contido pelo sistema imunitário, não causando a doença. Os indivíduos com a forma latente não apresentam quaisquer sintomas de TB, pelo que não são contagiosos, não podendo infectar outras pessoas. A maioria das pessoas com TB latente não desenvolve doença. Em geral, cerca de 5 a 10% das pessoas com TB latente, na ausência de tratamento, irão desenvolver TB ativa em algum momento da sua vida [5].

Estamos perante um caso de TB ativa quando o bacilo da TB se multiplica de tal forma que consegue superar a ação do sistema ou das defesas imunitárias do organismo em que se encontra, levando ao desenvolvimento da doença [5].

Pessoas com TB latente que estejam imunocomprometidas, por exemplo, infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), ou cujo sistema imunitário esteja enfraquecido por outro problema de saúde, podem desenvolver TB ativa [5].

### 1.1.2. Sintomatologia e transmissão

A TB é transmitida por via aérea, de uma pessoa para outra. O bacilo da tuberculose é libertado para o ar quando um indivíduo com a doença tosse ou espirra, projetando assim gotículas provenientes da garganta e dos pulmões que vão infectar outras pessoas que estão próximas [6,7].

Os sintomas de TB pulmonar ativa incluem tosse, por vezes com secreções ou sangue; dores no peito, fraqueza, perda de peso, febre e suores noturnos. Embora seja difícil diagnosticar TB observando apenas os sintomas, devido à sua inespecificidade, esta doença é tratável e a terapia é feita através de antibióticos durante pelo menos seis meses [7].



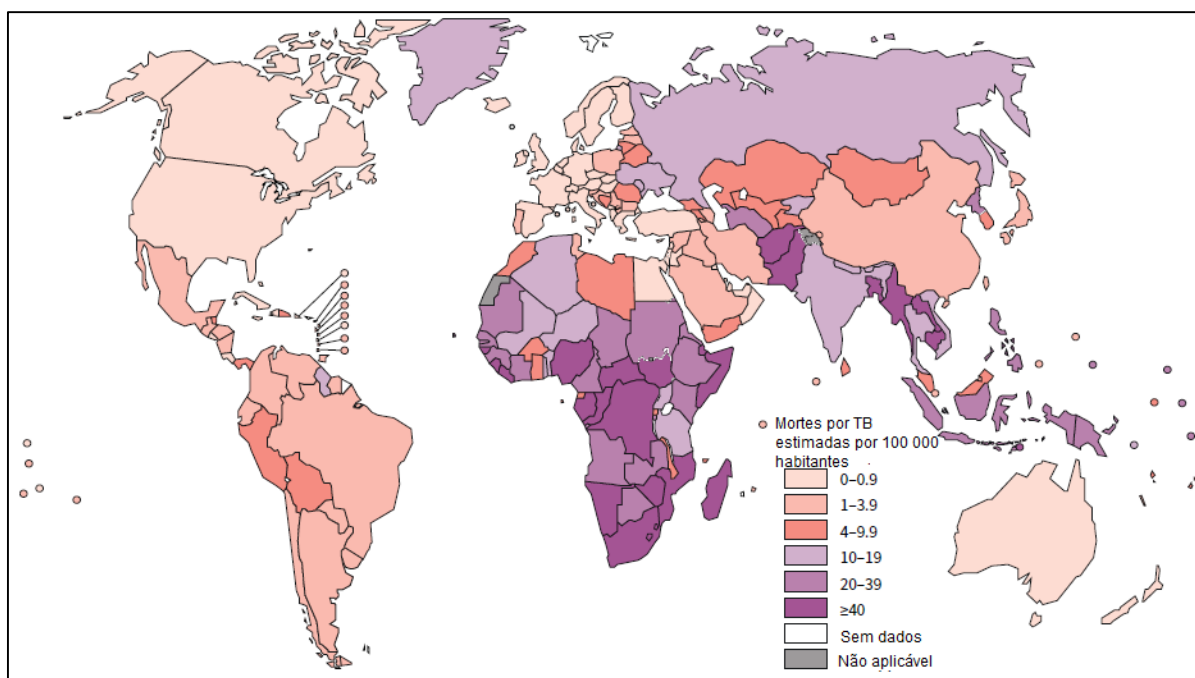
### 1.1.3. Emergência de estirpes resistentes a fármacos

O aparecimento de estirpes de *M. tuberculosis* resistentes aos fármacos está associado à ocorrência de mutações, potenciadas pelo seu longo tempo de divisão, baixa atividade metabólica e capacidade de entrar em estado de dormência [8].

São classificadas como TB multirresistente (MDR-TB) as estirpes de *M. tuberculosis* resistentes a isoniazida e rifampicina, os dois fármacos de primeira linha mais utilizados no tratamento de TB, e como extensivamente resistentes (XDR-TB) as estirpes multirresistentes que sejam adicionalmente resistentes às fluoroquinolonas e qualquer fármaco de segunda linha injetável, como amicacina, canamicina ou capreomicina [9].

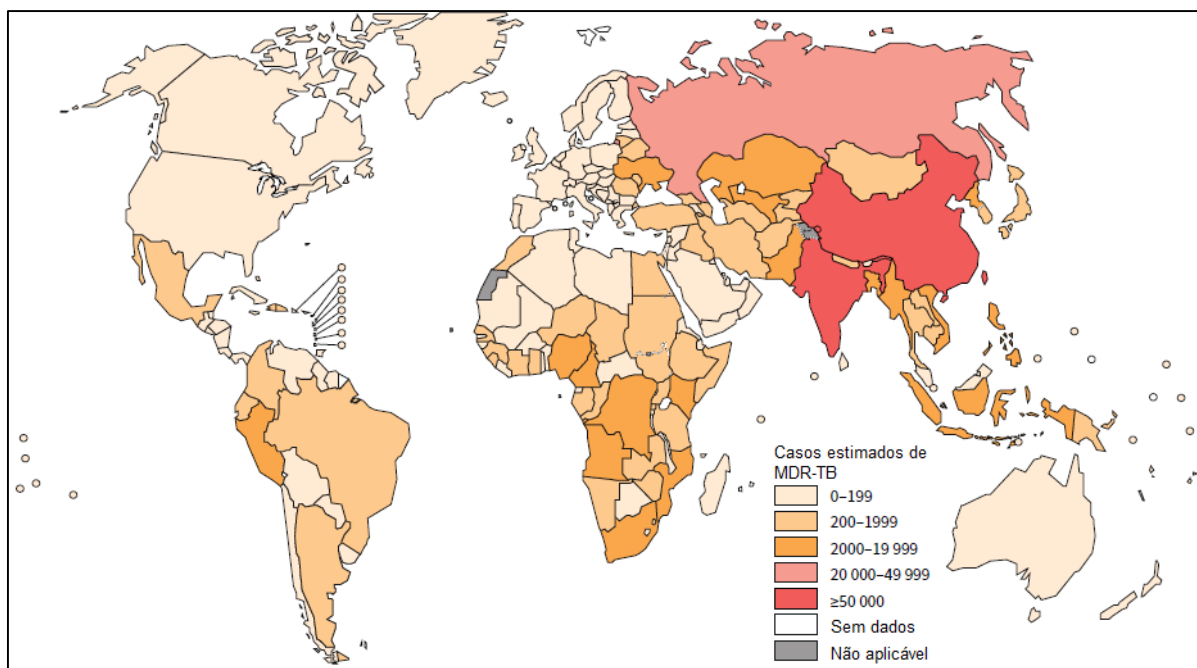
### 1.1.4. Epidemiologia

A TB continua a ser um grande problema de saúde global, sendo uma das doenças que mais fatalidades causa a nível mundial. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2013 (Figura 1.1) estimou-se que 9 milhões de pessoas desenvolveram TB e que 1,5 milhões morreram da doença (incluindo 360 000 mortes de pessoas infetadas com HIV) [7].



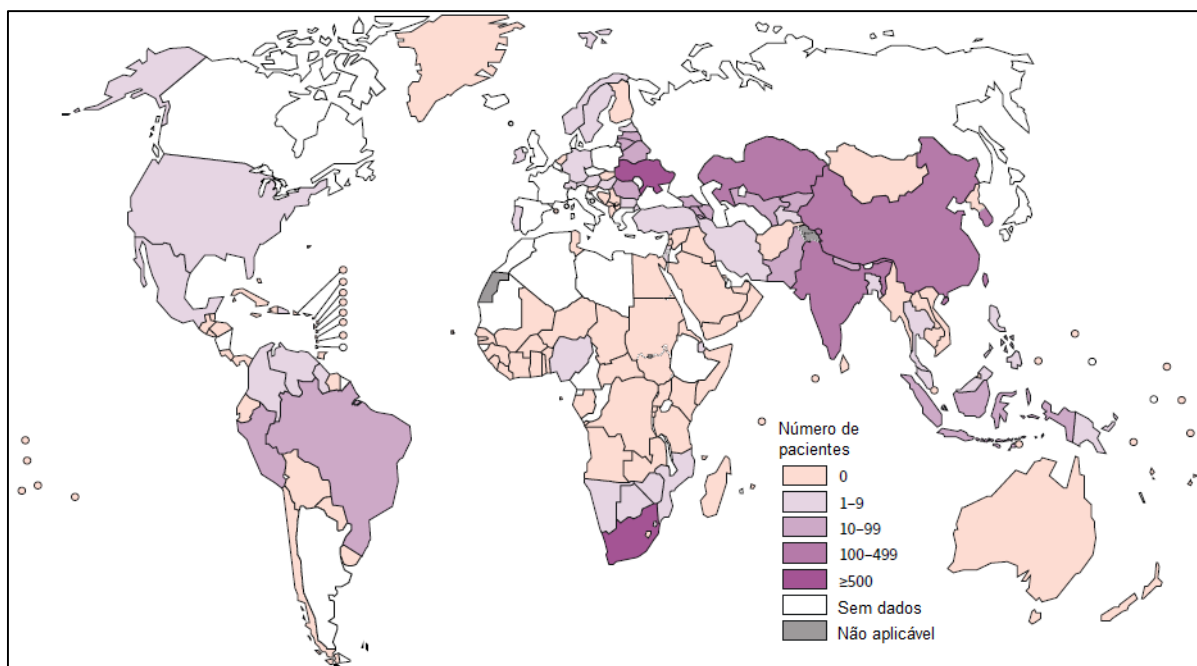
**Figura 1.1 – Distribuição geográfica das taxas de mortalidade por tuberculose estimadas em 2013, excluindo mortes por tuberculose de pessoas HIV-positivas.** Adaptado de WHO Global Tuberculosis Report, 2014 [7].

Globalmente, em 2013, dados de estudos de resistência a medicamentos e vigilância contínua entre os casos de TB notificados (Figura 1.2) sugerem que 3,5% dos recém-diagnosticados e 20,5% daqueles tratados anteriormente tinham MDR-TB. Isto traduz-se num número estimado de 480 000 pessoas que desenvolveram MDR-TB, com um número de mortes estimado de 210 000 [7].



**Figura 1.2 – Distribuição geográfica mundial do número estimado de casos de tuberculose multirresistente, em 2013.** Adaptado de WHO Global Tuberculosis Report, 2014 [7].

Até ao final do ano de 2013, 100 países reportaram pelo menos um caso de XDR-TB sendo que, em média, cerca de 9,0% dos casos de MDR-TB são XDR-TB (Figura 1.3) [7].



**Figura 1.3 – Distribuição geográfica do número de indivíduos aos quais foi confirmado laboratorialmente tuberculose extensivamente resistente até ao final do ano 2013.** Adaptado de WHO Global Tuberculosis Report, 2014 [7].

A TB é uma doença com uma terapêutica definida, mas o desenvolvimento de resistência aos antibióticos atualmente disponíveis faz com que esta se apresente de forma muito rápida e se transforme numa ameaça a nível global.

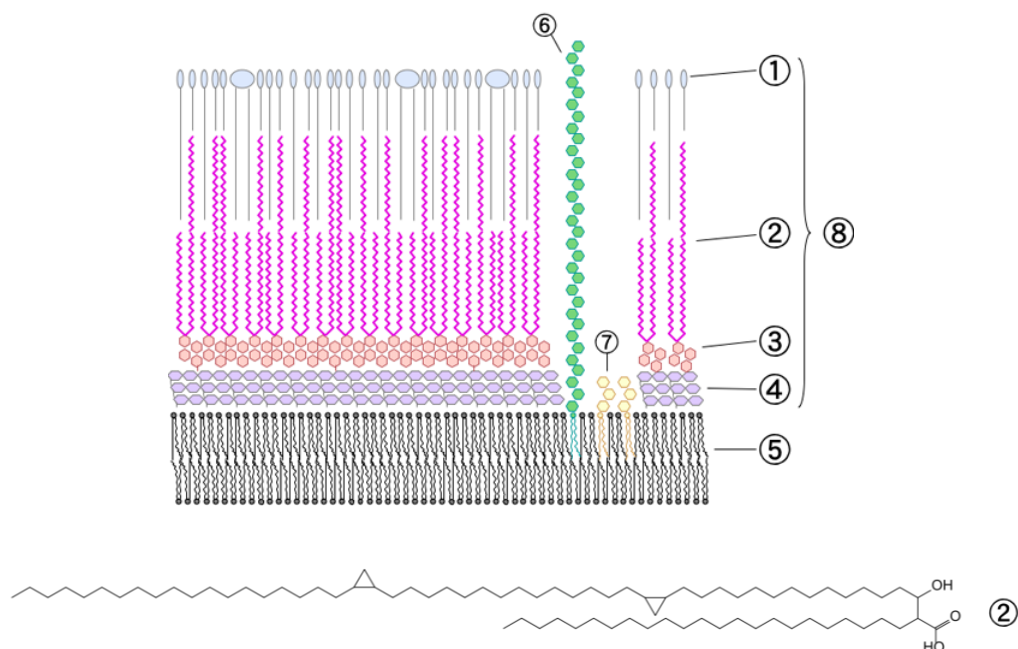
### 1.1.5. Género *Mycobacterium*

O género *Mycobacterium* pertence à ordem *Actinomycetales*, e à família *Mycobacteriaceae*. Este género compreende mais de 150 espécies diferentes [10]. Entre elas estão espécies patogénicas que podem causar doenças graves no homem e nos animais, como por exemplo, tuberculose e lepra. De um modo geral, as micobactérias são divididas em três grupos: complexo *M. tuberculosis* (MTC), Micobactérias não tuberculosas e *M. leprae* [11].

#### 1.1.5.1. Características gerais do género *Mycobacterium*

As micobactérias são bactérias aeróbias, sem mobilidade (com exceção de *M. marinum*, que foi demonstrado ser móvel dentro dos macrófagos) e com morfologia bacilar reta ou levemente curva com 0,2 - 0,7 µm de diâmetro e 1,0 - 10 µm de comprimento. Não contêm endósporos ou cápsulas [11].

A característica que distingue todas as espécies de *Mycobacterium* é a sua parede celular, bastante hidrofóbica, e rica em ácidos micólicos. Os ácidos micólicos são ácidos gordos formados por longas cadeias de carbonos (constituídas por até 60 a 90 átomos de carbono), que formam um invólucro lipídico em torno do organismo e afetam a permeabilidade da superfície da célula. A parede celular é constituída por uma camada hidrofóbica de ácidos micólicos e por outra de peptidoglicano que se encontram ligadas a um polissacarídeo, o arabinogalactano, por ligações éster (Figura 1.4) [12]. Dadas as características particulares da parede celular das micobactérias, elas têm uma reação variável na coloração de Gram, sendo coradas pela coloração de Ziehl-Neelsen, razão pela qual recebem a designação de bacilos álcool-ácido-resistentes [13].



**Figura 1.4 – Representação esquemática da parede celular das espécies do género *Mycobacterium*.** 1. Lípidos externos; 2. Ácido micólico; 3. Arabinogalactano; 4. Camada de peptidoglicano; 5. Membrana plasmática; 6. Lipoarabinomano (LAM); 7. Manósido Fosfatidilinositol; 8. Esqueleto da parede celular. Adaptado de Bhamidi S, 2009 [12].

### 1.1.5.2. Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

A TB em humanos e outros mamíferos é causada por espécies do MTC [14]. Este é constituído por um grupo de espécies de micobactérias que partilham cerca de 99,9% de homologia ao nível do DNA, sendo elas *M. tuberculosis*, *M. bovis* (incluindo a estirpe vacinal BCG), *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, [15], *M. pinnipedii* [16] e *M. caprae* [17]. Destas espécies, as que têm como hospedeiro principal o Homem são: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*.

Apesar da grande homologia genética, as espécies do MTC apresentam hospedeiros diferentes (Tabela 1.1).

**Tabela 1.1 - Membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis*.** Adaptado de Grange J, 2008 [18].

Espécies	Principal Hospedeiro
<i>M. tuberculosis</i>	Humano
<i>M. bovis</i>	Gado, veado, alce, bisonte, texugo, opossum
<i>M. caprae</i>	Cabra
<i>M. africanum</i>	Humano
<i>M. microti</i>	Ratazana, Lama
<i>M. canetti</i>	Humano
<i>M. pinnipedii</i>	Foca

De todas as espécies do MTC, a *M. tuberculosis* é a mais estudada uma vez que é responsável pela infeção de cerca de um terço da população humana, podendo também infetar animais em contacto com humanos.

#### 1.1.5.2.1. *Mycobacterium tuberculosis*

*M. tuberculosis* é um patógeno aeróbio obrigatório. Por este motivo, no caso clássico de TB, é sempre encontrado nos lobos superiores dos pulmões. É uma bactéria intracelular facultativa, e tem um tempo de geração lento, 24 horas, em comparação a outras bactérias (por exemplo *Escherichia coli* que se divide a cada 20 minutos, aproximadamente). Esta é uma característica fisiológica que contribui para a sua virulência, assim como a sua parede celular incomum, rica em ácidos micólicos [19].

Nos pulmões, o bacilo é “capturado” pelos macrófagos alveolares, mas estes são incapazes de o digerir e erradicar. A parede celular impede a fusão do fagossoma com o lisossoma, que contém uma série de fatores antimicobacterianos. Contudo, este bloqueio não impede a fusão de vesículas que contêm nutrientes. Consequentemente, a bactéria multiplica-se de forma não controlada dentro dos

macrófagos. Para além disso, impede a acidificação do fagossoma e a maturação do mesmo. Ainda impede a morte dos macrófagos neutralizando os seus intermediários reativos de azoto [20–22].

#### **1.1.6. Resistência a compostos antimicrobianos**

De um modo geral, os mecanismos de resistência das bactérias a antibióticos envolvem tanto a modificação do alvo terapêutico, normalmente causado por uma alteração genética (mutação) dos genes codificantes, como o impedimento da ação do próprio antibiótico [23,24]. Estes mecanismos incluem a inativação direta do antibiótico ou a diminuição do acesso ao alvo, por diminuição da permeabilidade da membrana ou por ativação de bombas de efluxo, o que resulta na redução da concentração intracelular dos fármacos antimicrobianos [23–25].

O efluxo consiste na extrusão ativa de uma determinada substância para o exterior de uma célula. Podemos encontrar exemplos de efluxo nos canais iónicos que, para manter o equilíbrio eletrolítico, permitem a passagem de iões do meio intracelular para o meio extracelular [26]. Os sistemas de efluxo são componentes naturais da célula bacteriana, onde desempenham diversas funções. Para além da eliminação de produtos resultantes do metabolismo celular, podem ainda remover fármacos antimicrobianos do meio intracelular para o extracelular, o que leva ao aparecimento de resistências à terapêutica [26].

A resistência intrínseca das micobactérias a fármacos antimicobacterianos é principalmente atribuída à permeabilidade das suas paredes celulares que contêm um elevado teor em lípidos, maioritariamente ácidos micólicos, em conjunto com o efluxo ativo de fármacos [25,27]. As camadas de peptidoglicano e arabinogalactano condicionam a entrada de moléculas hidrofóbicas, enquanto a camada de ácidos micólicos condiciona o acesso tanto de moléculas hidrofóbicas como de moléculas hidrofílicas [27]. Antibióticos relativamente hidrofóbicos, como rifampicina e fluoroquinolonas, podem entrar na célula por difusão através da bicamada hidrofóbica por canais idênticos a porinas [28]

Dado o papel significativo desempenhado pelos sistemas de efluxo no desenvolvimento de resistência aos fármacos em *M. tuberculosis*, principalmente nos primeiros passos de exposição, uma forma de evitar o desenvolvimento de resistências será a inibição das bombas de efluxo, utilizando para esse efeito inibidores de efluxo [29].

#### **1.1.7. Tratamento de Tuberculose**

A abordagem terapêutica da TB torna-se mais complexa do que a utilizada para outras infeções bacterianas, pois o microrganismo tem um longo tempo de divisão e capacidade de dormência, e a baixa atividade metabólica tornando-o num alvo terapêutico difícil. Além disso, o bacilo pode estar localizado em locais de difícil acesso por parte dos antibióticos ou de pH suficientemente baixo para inibir a atividade farmacológica [30].

O regime terapêutico da tuberculose consiste na utilização dos chamados fármacos de 1ª linha (isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol). A duração mínima do tratamento são seis meses, divididos numa primeira fase, de administração simultânea de todos os fármacos, seguida de uma segunda fase, em que se administram isoniazida e rifampicina. No entanto, a duração total do tratamento varia em função do órgão envolvido, evolução ou gravidade da doença, podendo ser superior a um ano. Contudo, a eficácia destes anti-bacilares tem sido comprometida, resultando num aumento bastante significativo do número de casos de TB multirresistente. Nestes casos, recorre-se à terapêutica de 2ª linha, que se mostra menos eficaz e mais tóxica para o doente, envolvendo períodos mais longos de tratamento [31].

#### **1.1.8. Novos alvos terapêuticos**

Nos últimos anos, foi reunida informação significativa ao nível dos componentes da cadeia respiratória de *M. tuberculosis*, o que permitiu identificar potenciais alvos terapêuticos.

A produção de ATP acoplada ao transporte de eletrões na cadeia respiratória é essencial para o crescimento do microrganismo, mas também representa um ponto fraco em micobactérias no estado de dormência. Embora a maioria das enzimas envolvidas na síntese de ATP sejam conservadas entre procariotas e eucariotas, estratégias que afetem a produção de ATP em micobactérias podem ser potenciais alvos terapêuticos a explorar no desenvolvimento de medicamentos antimicobacterianos [32].

A cadeia respiratória de *M. tuberculosis* pode sofrer adaptações para a sobrevivência da micobactéria no seu estado de dormência e/ou baixos gradientes eletroquímicos. A atividade da ATP sintase depende significativamente do gradiente eletroquímico gerado pelo transporte dos prótons citoplasmáticos para o periplasma [33] e, em *M. tuberculosis*, pode ser ativada por um baixo potencial de membrana [34]. Nesta situação, a ATP sintase continua ativa, fornecendo assim a energia necessária para a atividade celular.

A estratégia passa, então, por estudar enzimas-alvo da cadeia respiratória de *M. tuberculosis*, as quais não têm homólogos no metabolismo humano, como o caso da NADH desidrogenase do tipo II (NDH-2). Deste modo, o desenvolvimento de inibidores específicos para a NDH-2 de *M. tuberculosis* não afetaria o hospedeiro. Alternativamente, pequenas diferenças estruturais entre uma enzima bacteriana e sua homóloga humana podem ser utilizadas para o estudo de uma inibição seletiva, promovendo assim o desenho de novos compostos com atividade antimicobacteriana.

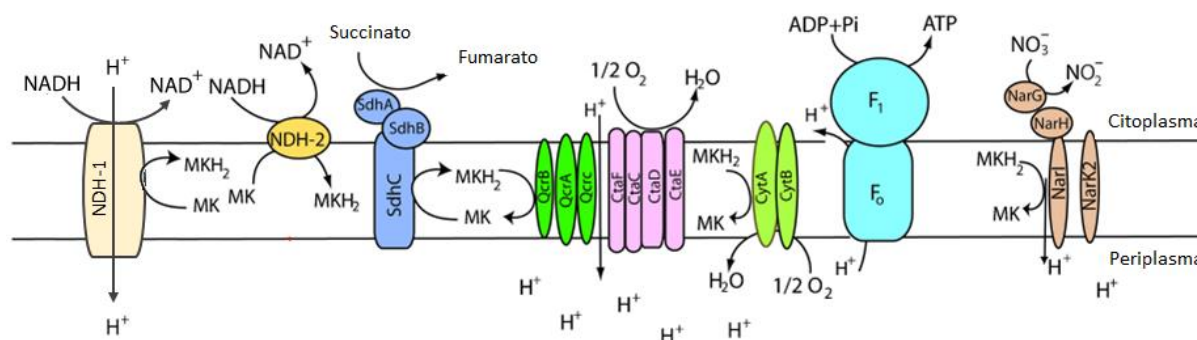
### **1.2. Cadeia Respiratória de *M. tuberculosis***

Muitas bactérias conseguem utilizar fontes de carbono fermentáveis e sintetizar ATP suficiente para o seu metabolismo pela via de fosforilação ao nível do substrato [34,35]. No entanto, em *M.*

*tuberculosis*, a síntese de ATP é preferencialmente obtida através da cadeia respiratória, via ATP sintase [36,37]

Na cadeia respiratória de *M. tuberculosis* e da maioria das micobactérias, existem dois tipos de NADH desidrogenases (NDH-1 e NDH-2) cuja função consiste na oxidação de NADH e a concomitante transferência dos elétrons para quinonas localizadas na membrana citoplasmática (Figura 1.5). Relativamente à existência dos dois tipos de NADH desidrogenase em micobactérias, tem existido um aceso debate. Alguns autores referem que a NDH-1 é necessária, preferencialmente, sob condições aeróbias [38], enquanto a utilização de NDH-2 é favorecida em condições anaeróbias ou não-replicativas (estado de dormência) [39]. Em contraste, outros autores demonstraram que a NDH-1 não é essencial para *M. tuberculosis* [39,40] e a sua utilização poderá ser desfavorável devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) geradas durante a oxidação do NADH através deste complexo [41]. Estudos de mutagenese em *M. smegmatis* indicaram que a NDH-2 desempenha uma função essencial na sobrevivência destas células [42]. A inibição da NDH-2 com tioridazina demonstrou ser bactericida para *M. tuberculosis*, enquanto a utilização de inibidores típicos da NDH-1 (rotenona) não mostrou ter um efeito significativo. A análise conjunta de ambos os dados permite afirmar que a NDH-2 é responsável pela maior parte da oxidação de NADH em micobactérias em estado de dormência [39].

A *M. tuberculosis* utiliza a NDH-2 para transferir os elétrons do NADH para a menaquinona (ou análogos), sendo por isso também designada como NADH-menaquinona oxidorreductase do tipo II (Figura 1.5). Nesta micobactéria existem duas formas da NDH-2, NDH-2 e NDH-2A [43], enquanto em *M. smegmatis* existe apenas uma [44].



**Figura 1.5 – Representação esquemática da cadeia respiratória de micobactérias.** A pool de menaquinona (MK) pode ser reduzida via NDH-1 (amarelo claro), NDH-2 (amarelo) ou succinato desidrogenase (azul escuro) e oxidada pelo supercomplexo citocromo *bc*<sub>1</sub> (verde-escuro) / citocromo *aa*<sub>3</sub> (rosa) ou pelo citocromo *bd* oxidase (verde claro). A força protomotriz é utilizada pelo ATP sintase (azul claro) para a produção de ATP. (Adaptado de Bald D, 2010 [32].

Após aceitar elétrons da NDH-2, a menaquinona reduz-se a menaquinol o qual pode ser reoxidado por duas vias alternativas, que terminam ou no supercomplexo citocromo *bc*<sub>1</sub>/citocromo *aa*<sub>3</sub> ou no citocromo *bd* oxidase [45]. Na via energeticamente mais eficiente, o menaquinol é oxidado pelo complexo citocromo *bc*<sub>1</sub> (subunidades QcrAC na Figura 1.5) que, em seguida, transfere elétrons para o citocromo *aa*<sub>3</sub> (subunidades CtaC a F na Figura 1.5) [46]. O complexo citocromo *bc*<sub>1</sub> e o citocromo

*aa<sub>3</sub>*, que em micobactérias provavelmente formam um supercomplexo, contribuem para a formação do gradiente eletroquímico ao nível da membrana citoplasmática [46,47]. Alternativamente, o menaquinol pode ser reoxidado diretamente pelo citocromo *bd* oxidase (CytAB) [48]. Esta reação não se encontra acoplada ao bombeamento de prótons, tornando a via citocromo *bd* oxidase menos eficiente em termos energéticos. No entanto, o citocromo *bd* oxidase apresenta uma maior afinidade para o oxigénio e é, assim, utilizado em situações de baixa concentração de oxigénio [48]. Deste modo o citocromo *aa<sub>3</sub>* é o aceitador final de eletrões predominante durante o crescimento aeróbio [42].

### 1.2.1. NADH-menaquinona oxidorredutase do tipo II (NDH-2)

A NDH-2 é comum em bactérias, fungos, plantas e alguns protistas. Em *M. tuberculosis* é codificada pelo gene *ndh* (Rv1854c), com 1392 pb, localizado adjacente aos genes *ureABCD*FG que codificam o supercomplexo urease [49]. A NDH-2 é constituída por uma única cadeia polipeptídica de 463 resíduos de aminoácidos, com uma massa molecular de 49618,9 Da, e existe na forma de monómero. As estruturas primárias das NADH oxidorredutases do tipo II possuem, geralmente, dois motivos GXGXXG (Figura 1.6) contidos em estruturas do tipo folha-β - hélice-α - folha-β para ligação de NAD(P)H e flavinas [49].



**Figura 1.6 – Os dois motivos GXGXXG da proteína NDH-2 de *M. tuberculosis* potencialmente responsáveis pela ligação de NADH e FAD, respetivamente.** Adaptado de Teh J, 2007 [49].

Esta enzima contém um dinucleótido de flavina e adenina (FAD), como cofator associado não covalentemente à cadeia polipeptídica e não contém centros de ferro-enxofre [49,50].

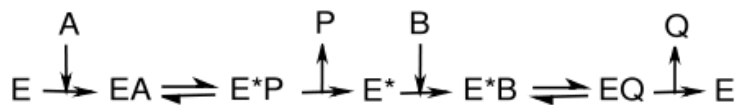
A NDH-2 é bastante conservada entre micobactérias, apresentando taxas de homologia de 91% e 83% em relação a *M. leprae* e *M. smegmatis*, respetivamente [49]. Em bactérias, a enzima encontra-se associada à membrana citoplasmática por um domínio transmembranar em hélice-α [50].

A NDH-2 catalisa a transferência de eletrões a partir do NADH, através do FAD, para a menaquinona. Foram propostos dois mecanismos catalíticos para a atividade da NDH-2: (i) *ping-pong* ou (ii) complexo ternário [43-46].

(i) No mecanismo *ping-pong* (Figura 1.7) dá-se a libertação de um ou mais produtos antes da ligação de todos os substratos à enzima. A enzima aparece temporariamente numa forma modificada,

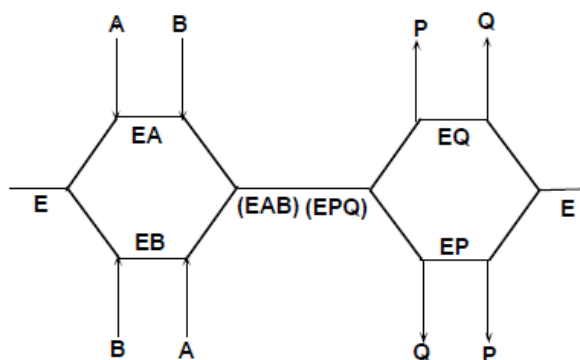


entre a ligação do primeiro substrato e a libertação do primeiro produto e a ligação do segundo substrato [55].



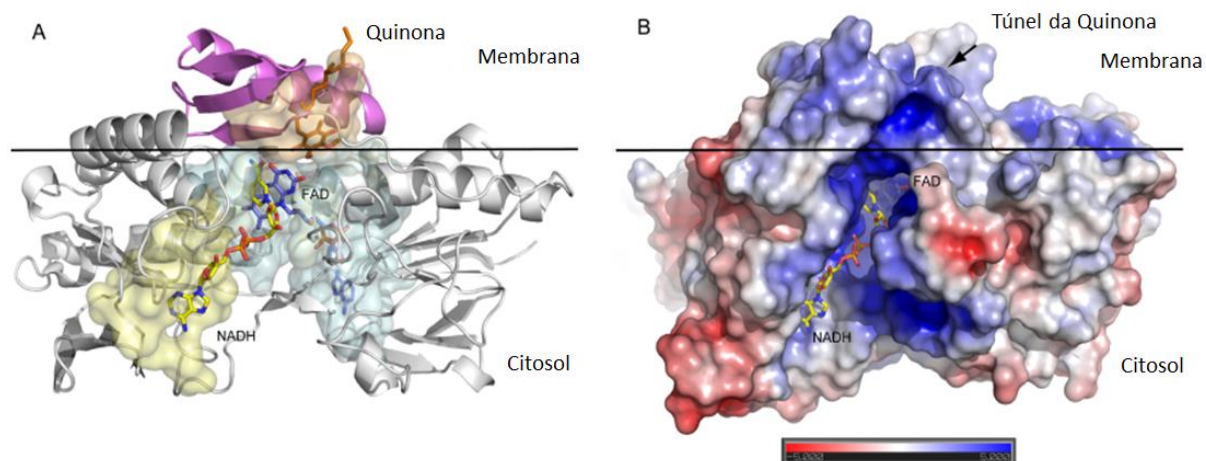
**Figura 1.7 – Mecanismo de *ping-pong* para uma reação enzimática.** A união dos substratos A e B tem lugar numa ordem definida e sequencial, por meio de um intermediário enzimático modificado, E\*. Adaptado de Catarino T, 2014 [55].

(ii) Por outro lado, as enzimas (E) que apresentam um mecanismo complexo ternário (Figura 1.8), unem ao mesmo tempo os dois substratos (A e B), dando lugar a um complexo ternário EAB. A ordem sequencial da união dos substratos pode ser ao acaso (mecanismo aleatório) ou seguir uma ordem em particular (mecanismo ordenado) [55].



**Figura 1.8 – Mecanismo de complexo ternário para uma reação enzimática.** A enzima E une os substratos A e B e liberta os produtos P e Q em ordem não definida. Adaptado de Catarino T, 2014 [55].

A estrutura obtida por raios-X da NDH-2 de *M. tuberculosis* ainda não se encontra resolvida. Dados estruturais obtidos por Heikal *et al.* (2014) [50] para a NDH-2 de *Caldalkalibacillus thermarum* (que partilha 31% de homologia com a NDH-2 de *M. tuberculosis*), revelaram a existência de regiões de ligação distintas para a menaquinona e para o NADH. Este arranjo permite a oxidação do NADH no citoplasma e a concomitante redução da menaquinona na membrana citoplasmática, com ambos os substratos a interagirem com o cofator FAD sequencialmente (Figura 1.9), ou seja, num mecanismo de *ping-pong*. No entanto, os autores não excluem a possibilidade da existência de um mecanismo ternário de catálise enzimática [50].



**Figura 1.9 – Representação da estrutura e locais de ligação dos substratos NADH e menaquinona na estrutura da NDH-2 de *Caldalkalibacillus thermarum*.** A – A estrutura da NDH-2 está representada a cinzento, com as regiões envolvidas na ligação de FAD (azul-escuro) e as possíveis regiões de ligação do NADH (amarelo) e da quinona (laranja). Os ligandos estão apresentados em “sticks”. A linha separa, aproximadamente, a região da NDH-2 que se encontra no citoplasma e a região de ligação à membrana. O domínio de ligação está destacado a magenta. B – Representação da superfície electrostática de (A) onde é possível verificar que a região de ligação do NADH apresenta um elevado conteúdo de cargas positivas. Adaptado de Heikal A, 2014 [50].

Como referido anteriormente, a NDH-2 de *M. tuberculosis* é um componente essencial da cadeia respiratória de micobactérias e não tem homólogos na mitocôndria humana, o que a torna um excelente alvo terapêutico. Assim sendo, o estudo de potenciais inibidores da atividade da NDH-2 torna-se importante e com elevado interesse tendo em vista futuras terapias da tuberculose.

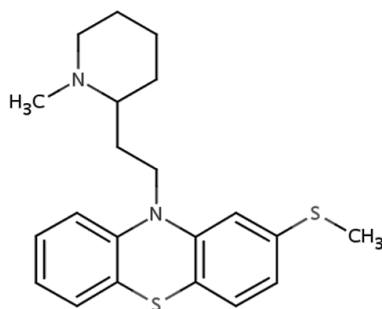
### 1.2.2. Compostos com atividade antimicobacteriana utilizados no estudo da NDH-2 de *M. tuberculosis*

A procura de novos compostos com potencial ação antimicobacteriana ou adjuvante dos antibióticos já existentes para tratar infeções multirresistentes de micobactérias tornou-se um objetivo importante no tratamento da TB e outras infeções bacterianas. Compostos que afetem a capacidade de efluxo das células são bastantes promissores, uma vez que poderão potenciar ou restaurar a ação dos antibióticos. Nos últimos anos, vários estudos evidenciaram que este efeito poderá dever-se à ação destes compostos na cadeia respiratória micobacteriana, que fornece a energia necessária ao funcionamento dos sistemas de efluxo, nomeadamente, por inibição da enzima NDH-2.

#### 1.2.2.1. Tioridazina

A Tioridazina (TZ) é uma fenotiazina que foi amplamente utilizada como fármaco antipsicótico no tratamento da esquizofrenia e psicose (Figura 1.10) [56]. Este composto é antagonista dos recetores de dopamina e inibidor da calmodulina, utilizado clinicamente como agente neuroléptico e antiemético, que inibe a atividade dos ATPases dependentes de cálcio, inibindo processos de transporte [57].

Relativamente à sua potencial aplicação no tratamento da TB, esta fenotiazina demonstra diversos efeitos, tendo sido já demonstrada a sua ação como um inibidor de efluxo e também como potenciadora da atividade antimicobacteriana dos macrófagos [26].

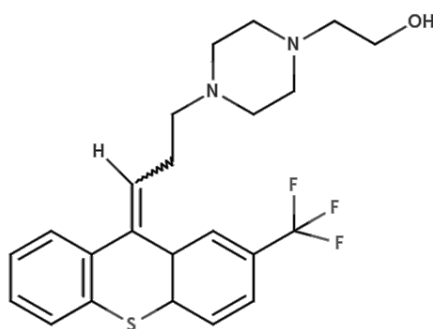


**Figura 1.10 – Estrutura da Tioridazina.**

#### 1.2.2.2. Flupentixol

O Flupentixol (FPX) é um medicamento antipsicótico típico da classe tioxanteno (Figura 1.11). É principalmente utilizado sob a forma de injeção de ação prolongada administrada uma vez a cada duas ou três semanas em indivíduos com esquizofrenia que têm dificuldade em seguir o regime terapêutico prescrito e que sofrem recaídas frequentes da doença. O FPX também é utilizado em baixas doses como um antidepressivo [58].

*M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. intracellulare* mostraram ser sensíveis ao FPX, quando este foi testado pela primeira vez em 1986 [29].



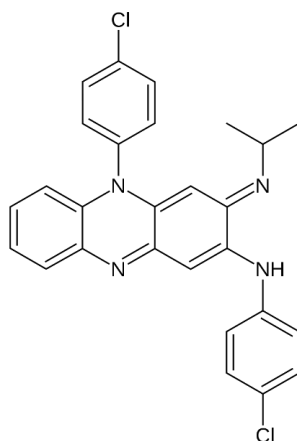
**Figura 1.11 – Estrutura do Flupentixol.**

#### 1.2.2.3. Clofazimina

A Clofazimina (CFZ) é uma iminofenazina (Figura 1.12) que é utilizada em combinação com Rifampicina e Dapsona no tratamento da lepra. Tem sido utilizada experimentalmente em combinação com outros fármacos antimicobacterianos para tratar infeções por *M. avium* em doentes com HIV e infeções por *M. avium paratuberculosis* em indivíduos com doença de Crohn. A Clofazimina também tem um efeito anti-inflamatório marcado e é utilizado para controlar a reação de lepra, eritema nodoso

leproso (ENH). Este composto é uma alternativa para os doentes de TB que não toleraram os efeitos adversos da Dapsona [59].

A Clofazimina liga-se às bases de guanina do DNA bacteriano, impedindo que o DNA funcione como molde na replicação, inibindo a proliferação de bactérias [59,60]. Também aumenta a atividade da fosfolipase bacteriana A2, que conduz à libertação e acumulação de lecitinas [59,60] que são tóxicas e inibem a proliferação bacteriana [61].

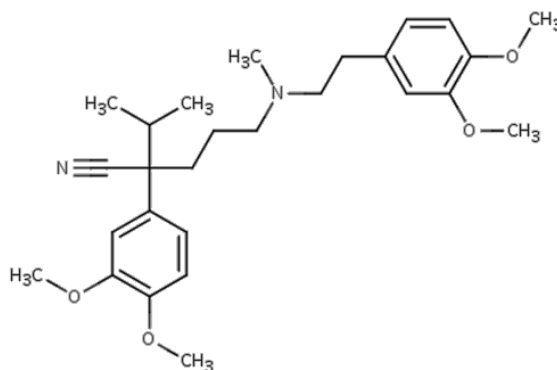


**Figura 1.12 – Estrutura da Clofazimina.**

#### 1.2.2.4. Verapamil

O Verapamil (VP) é um bloqueador dos canais de cálcio da classe fenilalquilamina (Figura 1.13). Tem sido utilizado no tratamento da hipertensão, angina de peito e arritmia cardíaca. É também utilizado em biologia celular como um inibidor de bombas de efluxo e da P-glicoproteína [62].

Vários estudos demonstraram que o VP possui uma forte capacidade de inibição do efluxo de brometo de etídio em *M. smegmatis*, complexo *M. avium* e *M. tuberculosis*, quando comparado com outros inibidores de efluxo como a TZ [29].



**Figura 1.13 – Estrutura do Verapamil.**

### 1.3. Objetivos

No decorrer deste trabalho foram testados vários compostos com atividade antimicobacteriana que foram utilizados no estudo da NDH-2 de *M. tuberculosis*, com a finalidade de verificar qual o seu efeito na atividade da enzima. Entre os compostos utilizados estão compostos que funcionam como inibidores de efluxo tais como, Tioridazina, Flupentixol, Clofazimina e Verapamil. Para além destes, foram estudados mais dois novos compostos, designados por PR e U4, sobre os quais apenas a informação obtida neste estudo pode ser descrita. A descrição detalhada destes compostos não pode ser indicada por razões de confidencialidade.

Para atingir os objetivos propostos foi avaliado o efeito dos diversos compostos na atividade da NDH-2 de *M. tuberculosis* em ambiente membranar; determinados os valores de concentração à qual um fármaco é capaz de inibir 50% da atividade de um dado processo biológico (IC<sub>50</sub>) e ainda os parâmetros cinéticos da enzima NDH-2 na presença de um dos compostos estudados (PR).

## Capítulo 2 – Materiais e Métodos

### 2.1. Meios de cultura, reagentes e soluções

Neste subcapítulo é apresentada a composição dos meios de cultura, reagentes e soluções utilizados no decorrer do trabalho experimental (Tabelas 2.1 a 2.3).

**Tabela 2.1 – Composição do meio de cultura para crescimento das estirpes de *M. smegmatis*.**

Composição (por litro)	
Meio <i>Middlebrook 7H9, Difco™</i> (pH 6,6 ± 0,2 a 25°C)	4,7 g
Tween 80 ( <i>Sigma-Aldrich</i> )	0,5 g
Ácido oleico-albumina-dextrose catalase (OADC, <i>Sigma-Aldrich</i> )	100 mL
Água bidestilada estéril	900 mL

**Tabela 2.2 – Reagentes e soluções.**

Reagentes/Soluções	Composição
Canamicina ( <i>Sigma-Aldrich</i> )	10,0 mg em 1 mL de água bidestilada estéril (MM = 483,5 g/mol)
Tetraciclina ( <i>Sigma-Aldrich</i> )	5,0 mg em 1 mL de metanol (MM = 444,4 g/mol)
Cianeto de Potássio 1 M (KCN, <i>Sigma-Aldrich</i> )	32,6 mg em 1 mL de tampão MOPS (MM = 65,1 g/mol)
Dinucleótico de β-dihidronicotinamida e adenina 25 mM (NADH, <i>VWR</i> )	17,6 mg em 1 mL de tampão MOPS (MM = 709,4 g/mol)
Fluoreto de fenilmetilsulfonil 100 mM (PMSF, <i>Sigma-Aldrich</i> )	17,4 mg em 1 mL de isopropanol (MM = 174,2 g/mol)
Menaquinona 40 mM ( <i>Sigma-Aldrich</i> )	17,8 mg em 1 mL de etanol absoluto (MM = 444,7 g/mol)
Rotenona 200 mM ( <i>Merck</i> )	78,9 mg em 1 mL de DMSO (MM = 394,4 g/mol)
Tampão Ácido 3-(N-morfolino)propanossulfônico, 50 mM (MOPS, <i>Nzytech</i> )	10,5 mg em 1 L de água bidestilada, pH 7,2 (MM = 209,3 g/mol)
Ubiquinona-1 50 mM (Coenzima Q1, <i>Sigma-Aldrich</i> )	12,5 mg em 1 mL de etanol absoluto (MM = 250,3 g/mol)

**Tabela 2.3 – Compostos com atividade antimicobacteriana.**

Composto	Composição
<b>Clofazimina</b>	5,0 mg em 1 mL de DMSO (MM = 403,4 g/mol)
<b>Flupentixol</b>	10,0 mg em 1 mL de água bidestilada estéril (MM = 507,4 g/mol)
<b>Tioridazina</b>	10,0 mg em 1 mL de água bidestilada estéril (MM = 407,0 g/mol)
<b>Verapamil</b>	10,0 mg em 1 mL de água bidestilada estéril (MM = 491,1 g/mol)
<b>PR</b>	14,8 mg em 1 mL de DMSO (MM = 391,5 g/mol)
<b>U4</b>	6,0 mg em 1 mL de DMSO (MM = 347,3 g/mol)

## 2.2. Equipamentos

A Tabela 2.4 apresenta um resumo de todos os equipamentos utilizados ao longo do trabalho experimental.

**Tabela 2.4 – Equipamentos utilizados.**

<b>Crescimento de <i>M. smegmatis</i> e indução da expressão de NDH-2 de <i>M. tuberculosis</i></b>
Estufa refrigerada, <i>Thermo Scientific™ MaxQ™ 4000</i>
<b>Isolamento das frações membranares de <i>M. smegmatis</i> wt e pT2</b>
French Press, <i>Thermo Scientific™ IEC</i>
Centrífuga 5804R com rotor F-34-6-38, <i>Eppendorf</i>
Ultracentrífuga <i>Optima LE-80K</i> com rotor 45Ti, <i>Beckman Coulter</i>
Sonicador <i>Labsonic® M Sartorius</i>
<b>Ensaio de atividade enzimática da NDH-2 de <i>M. tuberculosis</i> em ambiente membranal, na presença de compostos com atividade antimicobacteriana</b>
Espectrofotômetro <i>Evolution 300 UV-Vis</i> , <i>Thermo Scientific™</i> equipado com um sistema termostático por <i>Peltier</i>

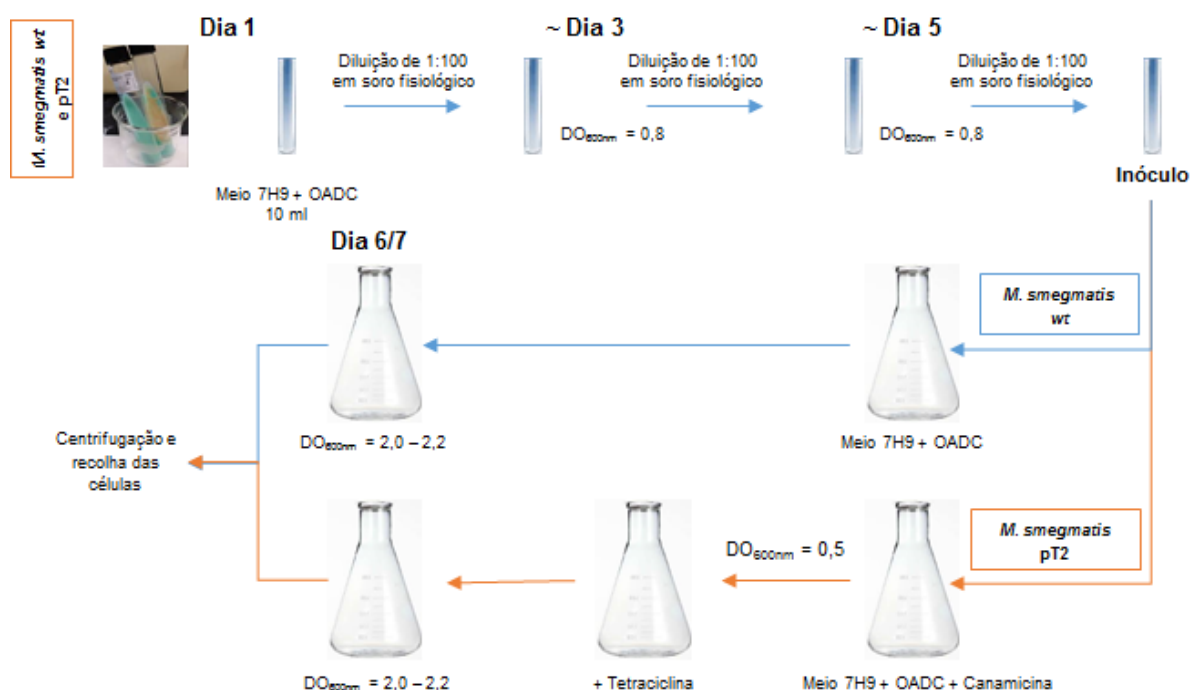
## 2.3. Procedimentos Experimentais

### 2.3.1. Expressão heteróloga da proteína NDH-2 de *Mycobacterium tuberculosis* em *Mycobacterium smegmatis* e isolamento da fração membranal

As estirpes mc<sup>2</sup>155 (*wild-type*) e mc<sup>2</sup>155:pMind:ndh-2 (pT2) de *M. smegmatis* foram cultivadas em meio líquido *Middlebrook 7H9* suplementado com 10% de OADC (ver Tabela 2.1). As culturas foram incubadas em estufa refrigerada a 37°C com agitação de 180 rpm e o seu crescimento foi monitorizado por medição da densidade ótica (DO) a 600 nm. A estirpe pT2 foi utilizada para expressar a proteína NDH-2 de *M. tuberculosis*, funcionando a estirpe wt como controle.

A estirpe pT2 foi previamente transformada com o plasmídeo pMind [63] que, para além de conter o gene que codifica para a proteína NDH-2 de *M. tuberculosis* (à qual foi adicionada uma cauda de histidinas, 6xHis-Tag), contém um promotor TetRO, indutível à tetraciclina e uma marca de resistência para a canamicina. Assim sendo, foram adicionados ao meio de crescimento 50 µg/mL de canamicina para garantir apenas o crescimento de transformantes pT2 (Figura 2.1). A indução da expressão da proteína NDH-2 foi efetuada pela adição de tetraciclina (75 ng/mL) ao meio de cultura, à DO de 0,5 (Figura 2.1).

O crescimento de ambas as estirpes foi terminado num intervalo de DO entre 2,0 e 2,2, correspondente a 6-7 dias após o seu início.



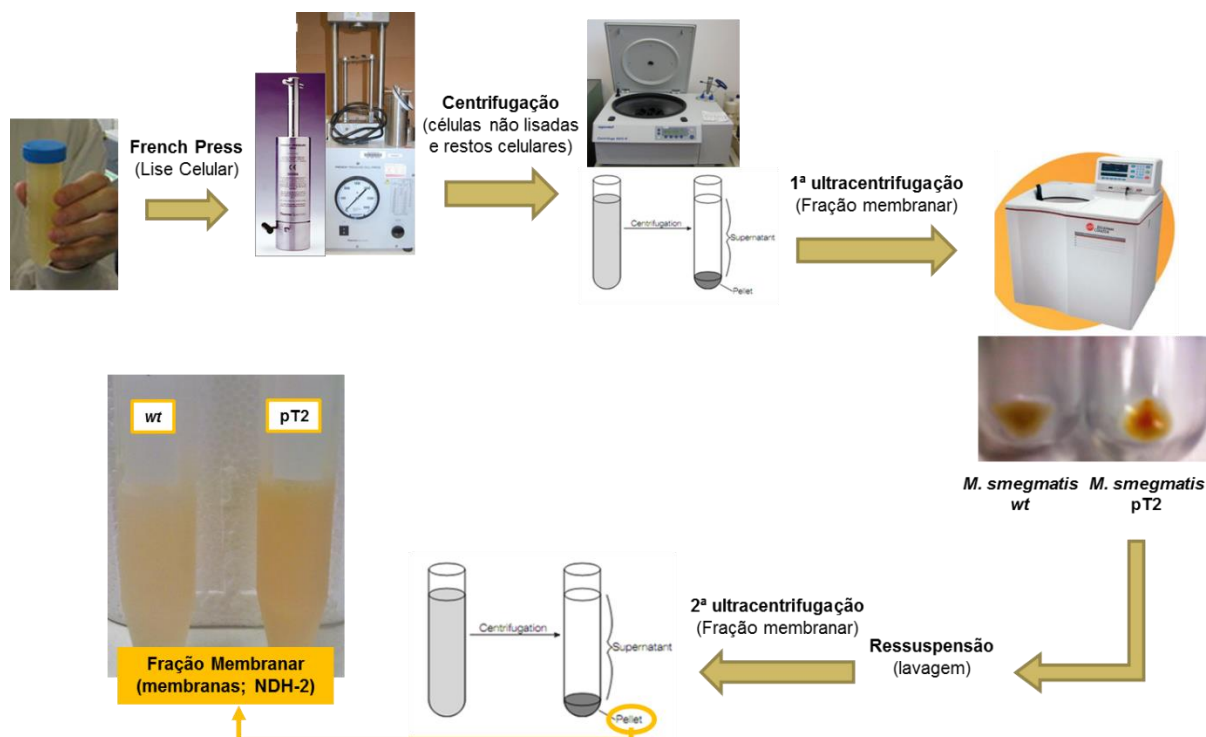
**Figura 2.1 – Representação esquemática do processo de crescimento de *M. smegmatis* wt e pT2 e indução da expressão da proteína NDH-2.**

Terminado o crescimento, as culturas de *M. smegmatis* wt (Msm wt) e *M. smegmatis* pT2 (Msm pT2) foram centrifugadas a 10000×g e as células ressuspensas em 50 mM de tampão MOPS a pH 7,2 contendo 1 mM de PMSF. As células de ambas as estirpes foram submetidas a lise por *French Press* à pressão de 40 psi. O processo de lise foi realizado 3 vezes para cada estirpe e, em seguida, ambas as suspensões foram centrifugadas a 13000×g durante 15 minutos, de forma a precipitar restos celulares e células não-lisadas.

O sobrenadante obtido foi ultracentrifugado a 225000×g durante 40 minutos a 4°C e o sedimento foi ressuspendido em 50 mM de tampão MOPS a pH 7,2, permitindo assim obter a fração membranar. O passo de ultracentrifugação foi repetido em seguida com o objetivo de fazer uma lavagem da fração membranar (Figura 2.2). O sedimento foi ressuspendido em 5 mL de tampão e a suspensão obtida foi homogeneizada num sonicador em modo de pulso de 80% de *output* durante 3 minutos com incubação



em gelo, sendo repetido o processo num total de duas vezes. As suspensões de membranas de Msm wt e Msm pT2 foram aliqüotadas e imediatamente congeladas em azoto líquido, sendo armazenadas a -80°C até utilização.



**Figura 2.2 – Representação esquemática do processo de isolamento das frações membranares de *M. smegmatis*.**

### 2.3.2. Monitorização do isolamento da fração membranar por eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) em condições desnaturantes das amostras recolhidas durante os vários passos de purificação foi realizada em géis *Amersham ECL 4-12%* pré-feitos num sistema *Amersham ECL Gel Box*, de acordo com as instruções do fabricante, utilizando marcadores *NZYColour Protein Marker II*, *Nzytech*. As amostras foram previamente incubadas durante 1h à temperatura ambiente em tampão de aplicação (Tabela 2.5) com SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol e centrifugadas antes da aplicação nos géis. Os géis foram posteriormente corados com uma solução de azul de Coomassie (*Merck*).

**Tabela 2.5 – Composição do tampão de aplicação para eletroforese SDS-PAGE.**

<b>Tampão de amostra SDS-PAGE</b>	66 mM Tris-HCl pH 6,8
	2% (p/v) SDS ( <i>Fluka</i> )
	26% (v/v) Glicerol ( <i>Fluka</i> )
	717 mM $\beta$ -mercaptoetanol ( <i>Merck</i> )
	0,01% (p/v) Azul de bromofenol ( <i>Sigma-Aldrich</i> )

Neste tipo de eletroforese, as proteínas migram através dos poros do gel de poliacrilamida em resposta a um campo elétrico aplicado, de acordo com o seu ponto isoelétrico (pI). O tratamento com SDS na presença de agentes redutores (como  $\beta$ -mercaptoetanol ou ditioneitol) promove o *unfolding* das cadeias polipeptídicas, originando uma estrutura em forma de bastonete cujo núcleo polipeptídico está coberto por moléculas de SDS. Este detergente confere carga negativa e igual densidade de carga a todas as proteínas, o que permite que migrem através da matriz do gel em direção ao ânodo e faz com que a separação seja realizada apenas com base na sua massa molecular. Assim, proteínas com menor massa molecular migram mais facilmente através da rede de poliacrilamida, apresentando maior mobilidade que proteínas de maior massa. O tamanho dos poros do gel diminui com o aumento da percentagem de acrilamida, pelo que géis com maior percentagem deste composto (cerca de 15%) utilizam-se para separar compostos de baixa massa molecular, enquanto géis com menor percentagem (cerca de 7%) se utilizam para separar compostos de elevada massa molecular. Depois de separadas em gel, as proteínas podem ser visualizadas por coloração do gel com uma solução corante de azul de Coomassie. Esta técnica permite obter informação sobre a pureza e o tamanho da proteína recombinante produzida [64,65].

#### **2.4. Ensaios de atividade enzimática da proteína NDH-2 de *M. tuberculosis* em ambiente membranar, na presença de compostos com atividade antimicobacteriana.**

O estudo da atividade enzimática da proteína NDH-2 nas suspensões membranares de Msm wt e pT2 foi realizado na presença dos substratos NADH e quinona. A oxidação de NADH foi monitorizada espectrofotometricamente a 340 nm numa *cuvette* de quartzo com 1 cm de percurso ótico (109.004-QS, Hellma® Analytics). Estes ensaios foram realizados à temperatura de 37°C com agitação.

##### **2.4.1. Otimização das condições dos ensaios de atividade enzimática**

Os ensaios de atividade enzimática foram, inicialmente, efetuados de acordo com o método descrito por Weinstein *et al.* (2005) [44] para a NDH-2 presente em suspensões membranares de *M. tuberculosis*. Neste método, os ensaios foram realizados com 3 mg/mL de suspensão membranar à qual foram adicionados 10 mM de KCN e 100  $\mu$ M de menaquinona (MenaQ). Os compostos testados foram adicionados conforme o desejado e a mistura reacional foi incubada durante 5 min a 30°C, sendo a reação iniciada pela adição de 100 mM de NADH.

Com o intuito de otimizar as condições dos ensaios efetuados no decorrer deste trabalho, diversos parâmetros foram testados, como variações de concentração das suspensões membranares (Msm wt e pT2) e dos reagentes utilizados (rotenona, KCN), assim como testes relativos à quinona utilizada como substrato (MenaQ ou Coenzima Q1) e ainda a ordem de adição dos diversos compostos.

Os ensaios de otimização foram realizados de acordo com o método descrito. Na variação de concentração de membranas Msm pT2 foram testadas as concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL.

Dado este estudo da atividade enzimática ter sido realizado em ambiente membranar, foi crucial garantir a oxidação exclusiva do NADH pela NDH-2. Para tal, foi necessário inibir outros componentes da cadeia respiratória capazes de também contribuir para o consumo de NADH (complexo I) ou receber elétrons por parte da quinona (família de citocromos *bd* oxidase). A rotenona e o KCN são, respetivamente, inibidores do complexo I da cadeia respiratória aeróbia e do citocromo *bd* oxigénio redutase. Posto isto, foram realizadas titulações de ambos os inibidores. No caso do KCN foram testadas as concentrações 0,5, 2,5, 10, 20, 30, 40 mM deste inibidor. Por outro lado, a rotenona foi testada nas concentrações de 50, 100, 200, 400 µM.

Foram ainda testadas duas quinonas diferentes, MenaQ e Q1, sendo a MenaQ o substrato utilizado pela NDH-2 [32] e Q1 uma quinona bastante utilizada em ensaios enzimáticos análogos [44,52,66]. O ensaio foi realizado nas mesmas condições para ambas as quinonas, isto é, na concentração de 100 µM.

A partir dos estudos efetuados, as condições finais dos ensaios foram definidas para 50 mM de tampão MOPS (pH 7,2) [67], 100 µM de rotenona e 20 mM de KCN. O NADH esteve presente na mistura em excesso, na concentração de 250 µM [44], tendo a reação sido iniciada com a adição de 100 µM de Q1 [44], igualmente em excesso. A concentração das suspensões membranares de Msm wt e pT2 utilizadas nos ensaios foi de 5 µg/mL. A ordem de adição dos reagentes foi estabelecida da seguinte forma: tampão MOPS, rotenona, KCN, suspensão membranar, NADH e Q1, perfazendo um volume total de 1 mL (Figura 2.3). Antes da adição de NADH a mistura reacional foi incubada durante 30 minutos a 37°C com agitação constante. A suspensão de membranas wt foi utilizada como referência de forma a verificar a sobreexpressão da proteína NDH-2 na suspensão de membranas pT2.



**Figura 2.3 – Representação esquemática do procedimento utilizado nos ensaios de atividade enzimática da proteína NDH-2 em ambiente membranar.**

### 2.4.2. Estudos cinéticos

Neste trabalho foi estudado o efeito de vários compostos antimicobacterianos na atividade da NDH-2 de *M. tuberculosis* presente nas suspensões membranares de Msm pT2. Os compostos utilizados foram: clofazimina (CFZ), flupentixol (FPX), tioridazina (TZ), verapamil (VP), PR e U4. O procedimento experimental seguido para estes ensaios foi semelhante ao descrito anteriormente, sendo o composto adicionado à mistura reacional antes da adição da suspensão membranar. A gama de concentrações de cada inibidor estudado permitiu obter valores de atividade desde 100% (sem inibição) até aproximadamente 0% (totalmente inibida). Estes ensaios foram realizados em triplicado.

Os ensaios referidos permitiram determinar o valor de IC<sub>50</sub> para cada composto testado, isto é, a concentração à qual um fármaco é capaz de inibir 50% da atividade de um dado processo biológico (ou componente de um processo). Quanto menor o valor de IC<sub>50</sub>, maior a capacidade de inibição do composto em estudo.

Utilizando a metodologia descrita anteriormente, com o objetivo de caracterizar o tipo de inibição relativamente ao substrato NADH e determinar os parâmetros K<sub>M</sub>, K<sub>I</sub> e V<sub>max</sub> na presença do composto PR, foram determinadas as atividades enzimáticas para diferentes concentrações de PR (2, 5, 40, 100 e 160 µM) mantendo a Q1 em condições saturantes e variando a concentração de NADH (25, 50, 100 e 250 µM).

## 2.5. Tratamento de resultados

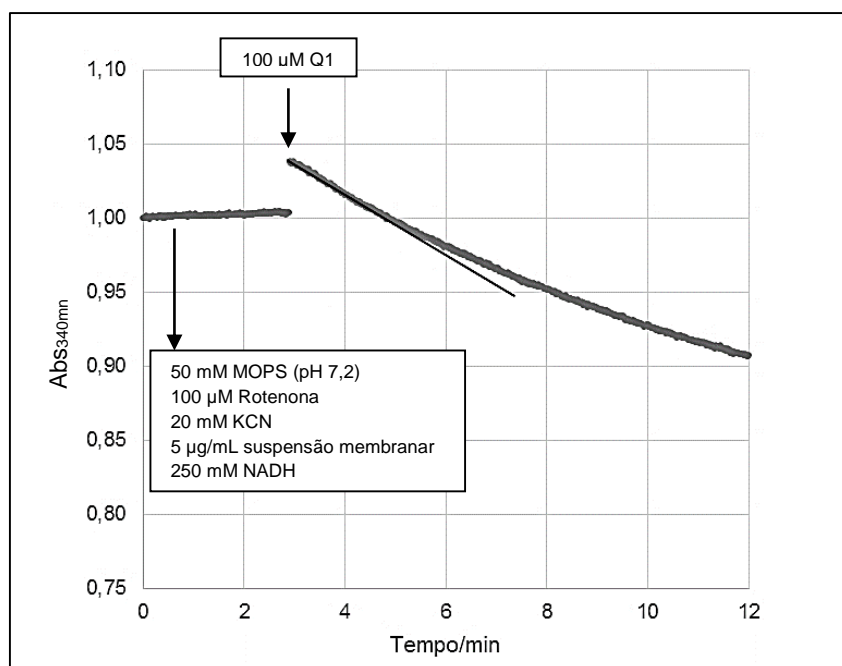
### 2.5.1. Cálculo da atividade específica da proteína NDH-2 de *M. tuberculosis* presente nas frações membranares

A atividade específica é um termo utilizado em cinética enzimática que se traduz na quantidade de produto formado por uma enzima num determinado período de tempo, por miligrama de proteína total presente na preparação. Esta é uma medida da quantidade de enzima ativa, por exemplo, calculada pela titulação da quantidade de locais ativos da enzima através da utilização de um inibidor irreversível [68].

No estudo da atividade enzimática da NDH-2 presente nas suspensões membranares de *M. smegmatis* wt e pT2, a variação da absorvância a 340 nm em função do tempo (Figura 2.4) permite determinar o valor de atividade específica da NDH-2. O cálculo deste valor é feito de acordo com a Equação 1.

$$\text{Atividade Específica } (\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}) = \frac{\text{Atividade } (\mu\text{mol min}^{-1})}{\text{massa}_{\text{proteína total}} \text{ (mg)}}$$

**Equação 1**



**Figura 2.4 – Curva de evolução temporal do ensaio cinético da proteína NDH-2 de *M. tuberculosis* em ambiente membranar.**

A concentração de NADH é obtida após adição da Q1, aplicando a lei de Beer-Lambert ao valor obtido para o declive aos pontos experimentais nos instantes iniciais (Equação 2).

$$c \text{ (mM)} = \frac{\text{Abs}_{340\text{nm}}}{\varepsilon \text{ (mM}^{-1}\text{cm}^{-1}) \ell \text{ (cm)}}$$

#### **Equação 2**

Considerando coeficiente de extinção molar a 340 nm ( $\varepsilon$ ) para o NADH de  $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [67], e o percurso ótico ( $\ell$ ) de 1 cm é possível determinar a concentração ( $c$ ) de NADH, em mM, que é oxidado por minuto. A concentração de NADH permite o cálculo do número de micromoles ( $n$ ) do mesmo aplicando a Equação 3.

$$n = c \times V$$

#### **Equação 3**

Calculado o número de micromoles de NADH, resta apenas saber o valor, em miligramas, da massa de proteína total utilizada nos ensaios de atividade. Sabendo que a concentração de proteína total utilizada foi de  $5 \text{ µg/mL}$ , e que o volume final dos ensaios é de 1 mL, é possível então calcular os valores de atividade específica para  $5 \text{ µg/mL}$  de suspensões membranares utilizando a Equação 1. O valor de atividade específica é então expresso em  $\text{µmol}$  de NADH por minuto por cada miligrama de proteína total.

## 2.5.2. Determinação do efeito inibitório da NDH-2 por compostos com atividade antimicobacteriana

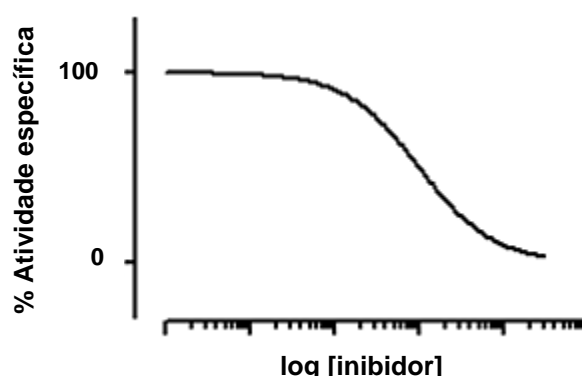
### 2.5.2.1. Determinação dos valores de concentração inibitória (IC<sub>50</sub>)

O estudo do efeito dos compostos com atividade antimicrobacteriana na atividade da proteína NDH-2 permitiu determinar o valor de concentração necessário para inibir em 50% a actividade máxima da enzima (IC<sub>50</sub>). Para isso recorreu-se ao *software GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os valores de atividade específica foram normalizados para percentagem de atividade e em seguida os valores de concentração de inibidor foram transformados no seu logaritmo. Os dados foram então analisados aplicando uma regressão não-linear (log [inibidor] vs. resposta, sendo que para este caso a resposta equivale a atividade específica) fornecida pelo programa, permitindo assim o cálculo dos valores de IC<sub>50</sub> – a concentração que provoca metade da resposta máxima (100 % de atividade) e simultaneamente a resposta mais inibida possível (~0% de atividade) (Equação 4 e Figura 2.5).

$$y = \frac{100 \% \text{ Atividade}}{1 + 10^{(x - \log IC_{50})}}$$

**Equação 4**

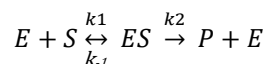
Nesta equação, x representa o logaritmo da concentração de inibidor que corresponde a 50% da atividade máxima da enzima



**Figura 2.5 – Representação gráfica da regressão não-linear log [inibidor] vs. Resposta.** Adaptado de GraphPad Software, San Diego, CA, USA.

### 2.5.2.2. Determinação dos parâmetros cinéticos da NDH-2 na presença e ausência de PR

No modelo mais simples (Michaelis-Menten) de uma reação enzimática, a enzima catalisa uma reação composta por duas reações elementares, nas quais o substrato (S) forma um complexo com a enzima (ES) e, posteriormente, é decomposto em produto (P) mais enzima [69]. Considerando as hipóteses restritivas de conservação total de enzima, condição de velocidade inicial e estado estacionário, as reações acima descritas podem ser representadas esquematicamente da seguinte forma:



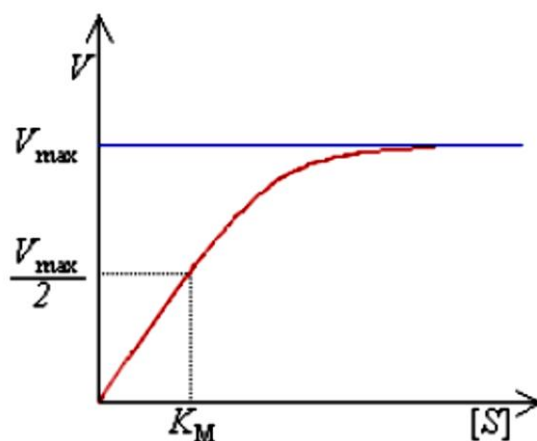
A conservação total de enzima assume que não ocorre desnaturação da mesma ao longo do ensaio. Na condição de velocidade inicial (correspondente a desprezar a conversão de produto em enzima-substrato (ES) porque a concentração de produto é muito reduzida no esquema anterior) as velocidades são determinadas a partir da tangente na origem da curva de formação de produto (ou consumo de substrato) na evolução temporal. A hipótese de estado estacionário, por sua vez, é validada experimentalmente utilizando uma concentração de substrato muito superior à concentração de enzima. Nesta situação a concentração do intermediário ES é sempre muito baixa e pode considerar-se constante ao longo do tempo ( $d[ES]/dt = 0$ ) [68].

De acordo com este modelo, quando a concentração de substrato se torna suficientemente elevada para converter toda a enzima na forma do complexo ES, o segundo passo torna-se limitante e a taxa global da reação fica insensível a aumentos adicionais na concentração do substrato [69]. A velocidade de conversão de um substrato em produto através de catálise enzimática pode ser determinada recorrendo à equação de Michaelis-Menten (Equação 5) [69]:

$$v_0 = \frac{V_M [S]}{K_M + [S]}$$

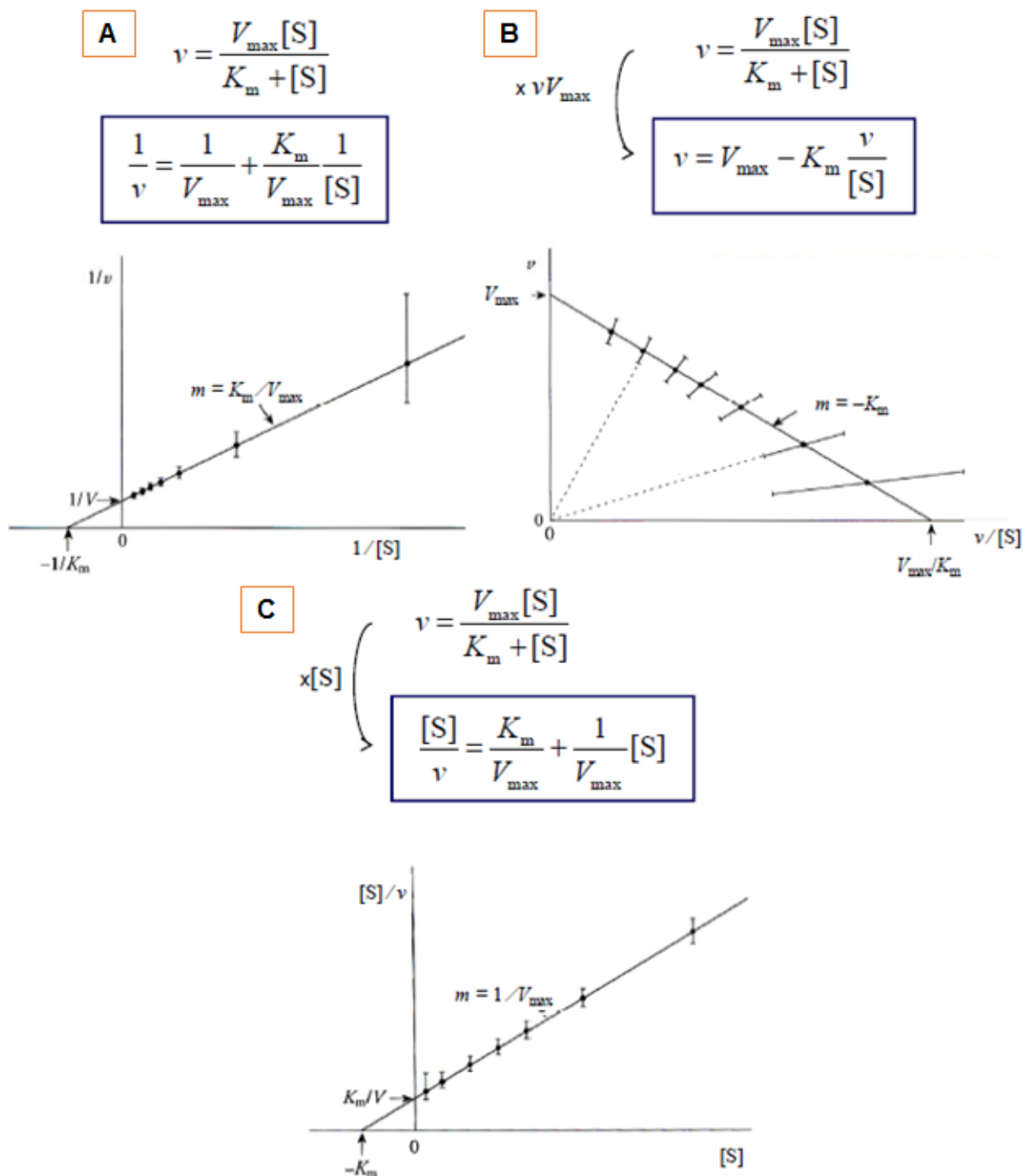
#### Equação 5

Na equação 6,  $v_0$  corresponde à velocidade inicial,  $V_{\max}$  à velocidade máxima e  $K_M$  reflete a afinidade de uma enzima com um determinado substrato. Quanto menor for este valor maior é a afinidade. A variação da velocidade inicial com a concentração de substrato é hiperbólica (Figura 2.6).



**Figura 2.6 – Representação gráfica da curva típica de Michaelis-Menten.** Adaptado de Weiner H, 2006 [69].

Para a determinação dos parâmetros cinéticos  $K_M$  e  $V_{\max}$  bem como o tipo de inibição do composto PR foram realizadas representações gráficas das linearizações de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf, sendo que todas derivam da equação de Michaelis-Menten (Figura 2.7).



**Figura 2.7 – Linearizações derivadas de equação de Michaelis-Menten. A: linearização de Lineweaver-Burk, B: linearização de Eadie-Hofstee; C: linearização de Hanes-Woolf.** Adaptado de Nelson D, 2000 [68].

Foi ainda complementado o estudo cinético pela construção gráfica das linearizações de Dixon e Cornish-Bowden. Estes dois métodos gráficos permitiram, em conjunto com as linearizações referidas anteriormente, determinar o tipo de inibição (ver Tabelas A1 e A2, em Anexo 1). O valor da constante  $K_i$  é calculado diretamente pela intersecção das retas obtidas pela representação gráfica de  $1/v$  (Dixon) e  $[NADH]/v$  (Cornish-Bowden) em função da concentração de inibidor [70].

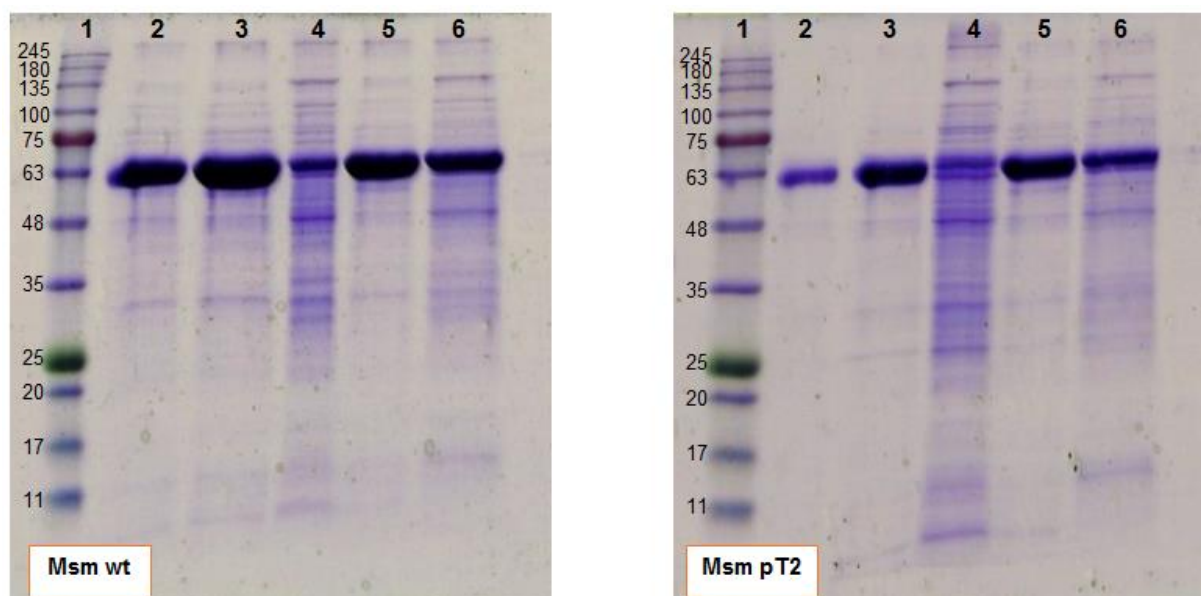




## Capítulo 3 – Resultados e Discussão

### 3.1. Monitorização do isolamento da fração membranar por eletroforese SDS-PAGE

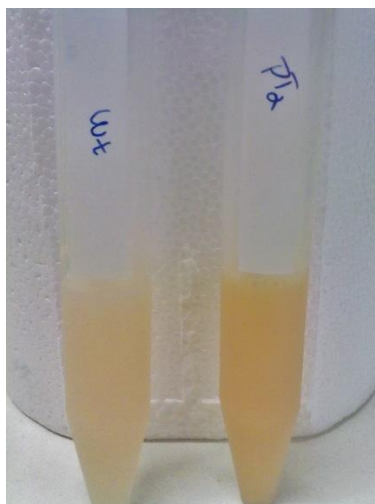
Na Figura 3.1, encontram-se os géis obtidos para as amostras recolhidas nos vários passos do isolamento da fração membranar das estirpes Msm wt e Msm pT2 (ver também Figura 2.2).



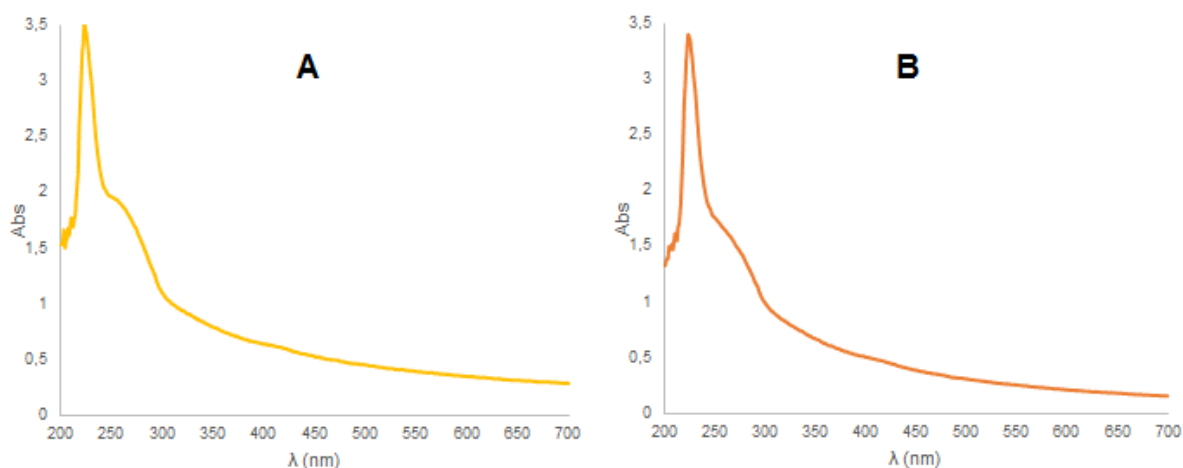
**Figura 3.1 – Exemplo dos géis obtidos após eletroforese SDS-PAGE.** 1. Marcador *NZYColour Protein Marker II* (Nzytech), 2. Suspensão de células lisadas por *French Press* 3. Sobrenadante (centrifugação), 4. Sedimento (centrifugação), 5. Sobrenadante (1ª ultracentrifugação), 6. Fração membranar - Sedimento (1ª ultracentrifugação).

A análise dos géis demonstrou que em ambas as estirpes são detetadas proteínas a cerca de 50 kDa (géis não normalizados), o que seria de esperar, já que a estirpe Msm wt expressa também a sua própria NDH-2.

Tendo em conta a distinta cor amarela (que corresponde à presença de níveis superiores de FAD) observada da fração membranar obtida para a estirpe transformada (Figura 3.2) e, embora as amostras não tenham sido normalizadas, esperava-se obter no gel de SDS-PAGE um perfil distinto para estirpe transformada, refletindo a sobreexpressão da NDH-2. No entanto, tal não foi observado. Esta observação poderá ser explicada pelo facto da NDH-2 estar incorporada na suspensão membranar, o que fará com que esta fique mais retida e não migre no gel de SDS-PAGE. Esperava-se também um espectro de UV-Vis com uma banda mais intensa entre os 365 e 450 nm, o que não se verificou (Figura 3.3)



**Figura 3.2 – Frações membranares das estirpes wt e pT2 de *M. smegmatis*.**



**Figura 3.3 – Espectros de UV-Vis das frações membranares wt (A) e pT2 (B).**

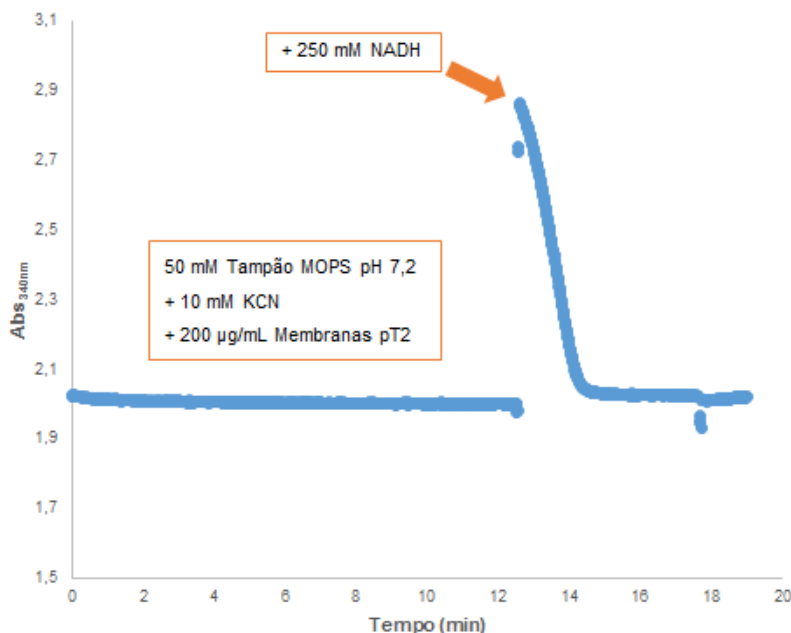
### **3.2. Ensaios de atividade enzimática da NDH-2 de *M. tuberculosis* em ambiente membranar, na presença de compostos com atividade antimicobacteriana**

Como referido anteriormente, a NDH-2 encontra-se na cadeia respiratória de *M. tuberculosis* e *M. smegmatis*. Esta proteína utiliza dois substratos, o NADH e a quinona. Assim sendo, uma vez que o presente estudo foi realizado em ambiente membranar, foi necessário garantir a inibição de outros complexos da cadeia respiratória que pudessem interagir com qualquer um dos substratos em causa.

#### **3.2.1. Otimização das condições dos ensaios de atividade enzimática**

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados, numa primeira abordagem, de acordo com o método descrito por Weinstein *et al.* (2005) [44] e resumido no Capítulo dos Materiais e Métodos

(Capítulo 2). Utilizando as condições descritas pelo mesmo verificou-se que a cadeia respiratória não se encontrava totalmente inibida, isto é, o NADH não era apenas oxidado pela NDH-2, uma vez que se verificava a sua oxidação antes da adição de quinona (Figura 3.4).

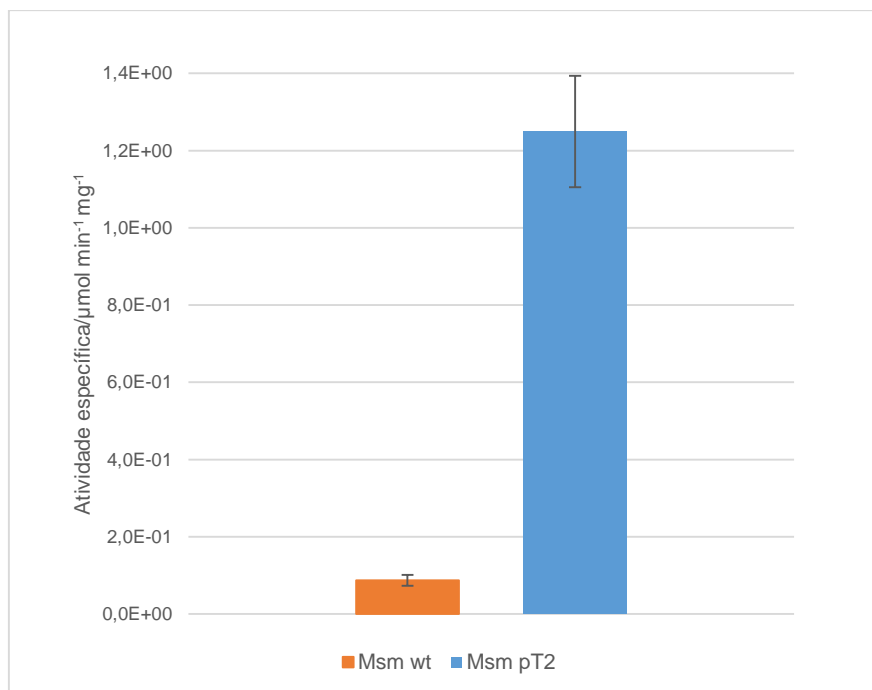


**Figura 3.4 – Ensaio de atividade onde a cadeia respiratória não se encontrava inibida.**

Posto isto, foi necessário rever o método de Weinstein *et al.* (2005) [44] e adaptá-lo ao sistema em causa. Os resultados obtidos nas sucessivas etapas de otimização do método encontram-se indicados em seguida.

#### **3.2.1.1. Seleção da estirpe a utilizar nos ensaios de determinação da atividade específica da NDH-2**

O primeiro passo no estudo da atividade enzimática da NDH-2 de *M. tuberculosis* foi averiguar se a enzima se encontrava sobreexpressa nas membranas de Msm pT2, uma vez que a análise do gel de SDS-PAGE se revelou inconclusiva. Para tal, foram realizados ensaios de atividade utilizando as suspensões membranares Msm wt e Msm pT2 nas mesmas condições. As atividades enzimáticas específicas obtidas encontram-se indicadas na Figura 3.5 e Tabela 3.1.



**Figura 3.5 – Atividade específica da NDH-2 presente nas estirpes Msm wt e pT2.**

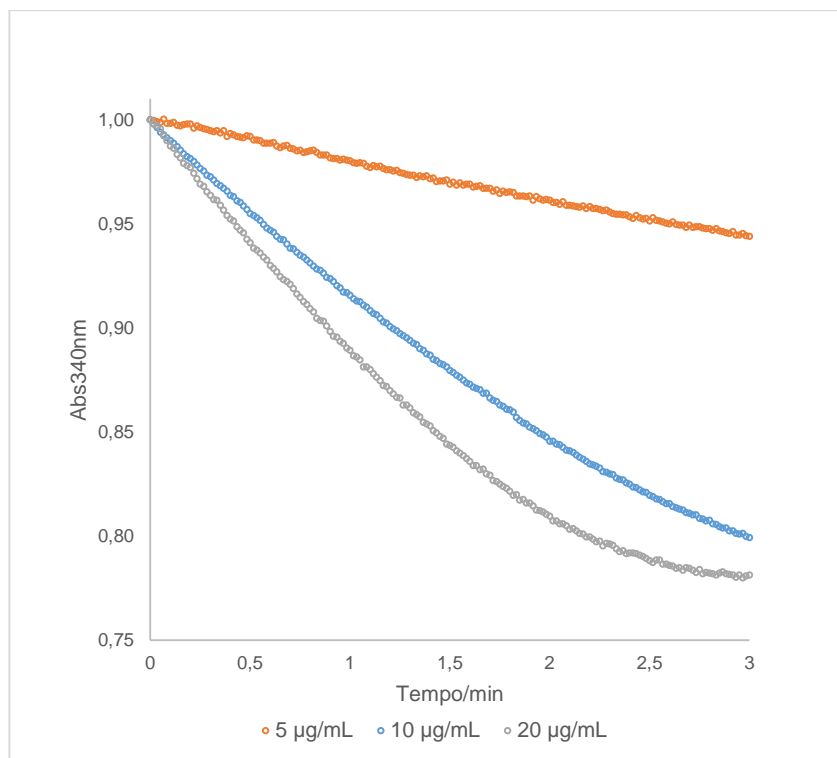
Os resultados obtidos demonstraram que, no caso da estirpe transformada, a taxa de oxidação de NADH pela estirpe pT2 é significativamente superior (cerca de 15 vezes) comparativamente à da estirpe wt sendo possível concluir que a NDH-2 se encontra sobreexpressa e ativa, nas membranas de Msm pT2.

**Tabela 3.1 – Valores de atividade específica da NDH-2 presente nas estirpes Msm wt e pT2 e respectivos desvios padrão.**

Suspensão membranar	Atividade específica (μmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	Desvio padrão (δ) (μmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )
<b>Msm wt</b>	8,7E-02	1,4E-02
<b>Msm pT2</b>	1,3E+00	1,4E-01

### 3.2.1.2. Otimização da concentração de membranas Msm pT2

Tendo em vista a verificação das condições de velocidade inicial nos ensaios enzimáticos, foi estudado o efeito da variação da concentração de suspensão membranar Msm pT2 na atividade da NDH-2 (Figura 3.6). Deste modo, otimizou-se a concentração de suspensão membranar pT2 de forma a garantir uma variação linear da atividade durante um intervalo de tempo suficientemente longo que permita determinar com maior exatidão a atividade enzimática e garantir as condições de velocidade inicial no decorrer dos ensaios.

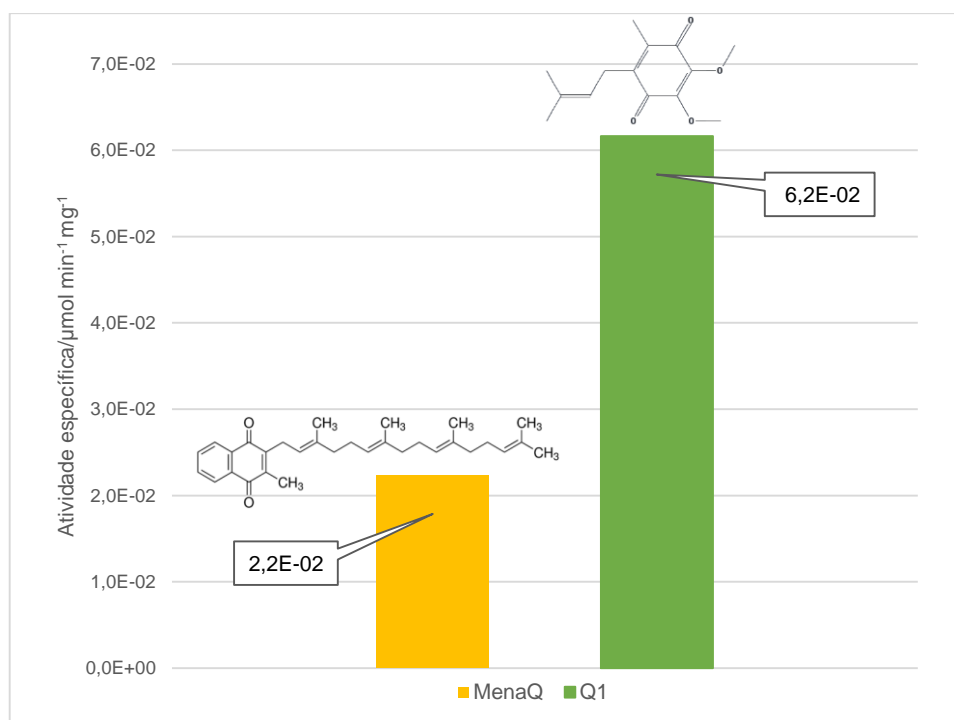


**Figura 3.6 – Curvas de evolução temporal dos ensaios de determinação de atividade da NDH-2 para diferentes concentrações de membranas de Msm pT2 (5, 10 e 20 µg/mL).** As curvas de evolução temporal foram obtidas a 37°C para 5, 10 e 20 µg/mL de suspensão membranar Msm pT2 em 50 mM de tampão MOPS (pH 7,2), 100 µM de rotenona, 20 mM de KCN, 250 µM NADH e 100 µM de Q1.

Pela observação da figura 3.6, verificou-se que, das concentrações testadas, aquela que apresentava o perfil pretendido era a concentração de 5 µg/mL de suspensão membranar Msm pT2. Nesta concentração, a velocidade é suficientemente lenta para que a linearidade seja mantida durante um período de tempo mais longo, e assim garantir condições de velocidade inicial durante o tempo de execução dos ensaios.

### 3.2.1.3. Seleção da quinona: menaquinona versus coenzima Q1

Em micobactérias, as quinonas predominantes são menaquinonas [71]. Contudo, existem também descritos na literatura ensaios de atividade enzimática efetuados na presença de análogos de menaquinona [44,52,67]. Estes ensaios mostraram que a NDH-2 apresenta uma maior atividade utilizando outras quinonas, como Q1, quando comparada com a atividade verificada com a utilização de menaquinona [44,52,67]. Assim sendo, nesta fase da otimização dos ensaios de atividade enzimática, foram testadas duas quinonas, a MenaQ e um análogo da ubiquinona, a Q1 (Figura 3.7).

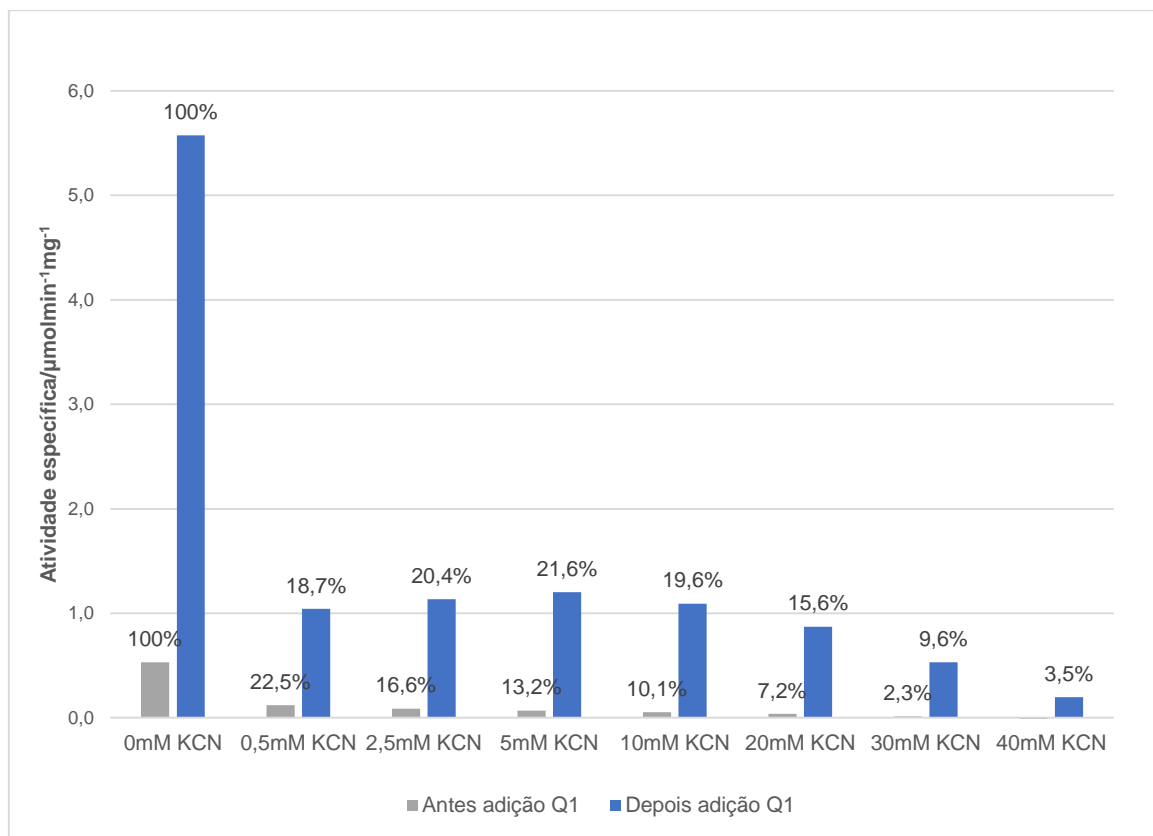


**Figura 3.7 – Atividade específica da NDH-2 de *M. tuberculosis* na presença de 100 µM de MenaQ e Q1.**

Comparativamente à MenaQ, a Q1 apresenta uma atividade cerca de 3 vezes superior (Figura 3.7). Este facto facilita a observação do efeito dos inibidores durante a oxidação do NADH, motivo pelo qual foi escolhida como substrato da NDH-2 para os ensaios subsequentes de determinação de atividade enzimática.

#### 3.2.1.4. Otimização da concentração do inibidor KCN

Tanto na cadeia respiratória de *M. tuberculosis* como na de *M. smegmatis*, o quinol, resultante da redução da quinona pela NDH-2, pode ser reoxidado a quinona pelo supercomplexo citocromo *bc*<sub>1</sub>/citocromo *aa*<sub>3</sub> ou pelo citocromo *bd* oxidase. Para estudar exclusivamente a atividade da NDH-2, é necessária a inibição das atividades referidas anteriormente, usando-se, para o efeito KCN, que inibe especificamente os citocromos *aa*<sub>3</sub> oxigénio redutases, mas também até certo ponto os citocromos *bd*. A titulação deste inibidor (Figura 3.8) permitiu determinar a melhor concentração a utilizar nos ensaios.



**Figura 3.8 – Variação da atividade específica da NDH-2 de *M. tuberculosis* na presença de diferentes concentrações de KCN.**

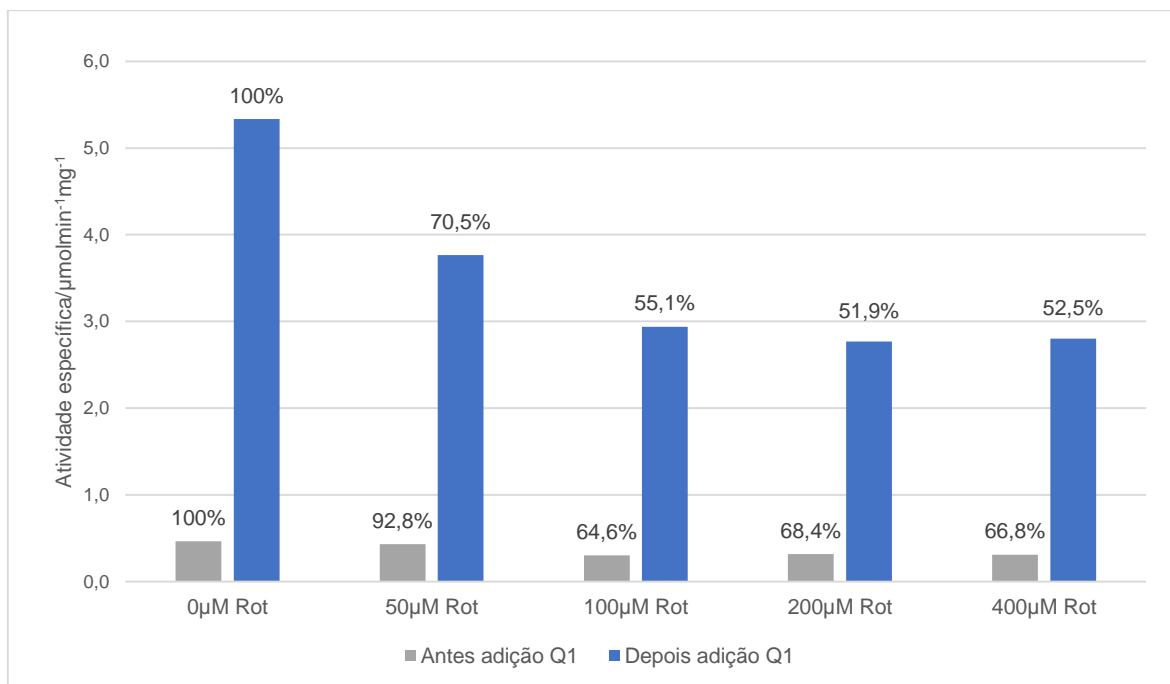
Os dados obtidos demonstraram que a partir de uma concentração de 10 mM de KCN foi possível inibir cerca de 90% da cadeia respiratória (Figura 3.8, barras a cinzento). Contudo, verificou-se que a partir dos 20 mM de KCN a atividade da NDH-2 (Figura 3.8, barras a azul) também era afetada por este inibidor, isto é, para as concentrações de 30 mM e 40 mM de KCN a atividade da NDH-2, que se mantivera relativamente constante, baixou cerca de 6%. Deste modo, foi selecionada a concentração de 20 mM de KCN para utilização nos ensaios de determinação de atividade da NDH-2.

### 3.2.1.5. Otimização da concentração do inibidor do complexo I (rotenona)

Para além dos complexos da cadeia respiratória que regeneram o aceitador de eletrões da NDH-2 (quinona) permitindo a oxidação do NADH, existe outro complexo que também oxida NADH para produção de energia. Este complexo trata-se do complexo I, denominado também NDH-1. Encontra-se descrito que a NDH-1 é utilizada preferencialmente em condições aeróbias, enquanto o uso de NDH-2 é favorecido sob condições não-replicativas ou anaeróbias [71].

Como já referido, pretende estudar-se apenas a atividade da NDH-2 e, sendo o NADH um dos seus substratos, foi essencial garantir que este era exclusivamente oxidado pela enzima. Assim, foi necessário adicionar rotenona – inibidor do complexo I – aos ensaios de atividade. A titulação deste inibidor permitiu aferir a concentração final a utilizar nos mesmos (Figura 3.9).





**Figura 3.9 – Variação da atividade específica da NDH-2 de *M. tuberculosis* na presença de diferentes concentrações de rotenona (rot).**

A titulação de rotenona evidenciou que o complexo I se encontrava ativo. Quando o inibidor estava presente no ensaio, a atividade observada antes da adição de Q1 (Figura 3.9, barras a cinzento) diminuiu, indicando que houve inibição.

Os resultados obtidos indicaram que a rotenona permite inibir até 35% da atividade da cadeia respiratória, e esta percentagem verificou-se à concentração de 100 μM, razão pela qual foi a concentração escolhida para prosseguir com os ensaios de atividade da NDH-2.

Estabelecidas as concentrações de KCN (20 mM) e de rotenona (100 μM), foram realizados ensaios com o objetivo de verificar a ação conjunta destes inibidores na cadeia respiratória (Tabela 3.2).

**Tabela 3.2 – Comparação dos valores de atividade específica obtidos na ausência e presença dos inibidores dos complexos da cadeia respiratória.**

	Atividade específica ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	Desvio padrão ( $\delta$ ) ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	% Inibição
Sem rotenona e KCN	5,0E-01	4,8E-02	0
100 μM rotenona e 20 mM KCN	1,4E-02	3,8E-03	97,2

A Tabela 3.2 apresenta os valores de atividade específica obtidos para os ensaios realizados na presença e ausência dos inibidores da cadeia respiratória. Estes dados permitem afirmar que a utilização conjunta destes inibidores nos ensaios de atividade da NDH-2 garante uma inibição de cerca

de 97% da cadeia respiratória, o que permite concluir que após a adição de Q1 a atividade específica obtida é devida exclusivamente à NDH-2 de *M. tuberculosis* presente nas membranas de Msm pT2.

### 3.2.1.6. Ordem de adição dos compostos nos ensaios cinéticos

A ordem de adição dos reagentes utilizados nos ensaios de atividade da NDH-2 foi importante no sentido de facilitar a monitorização da reação que estava a ocorrer.

Weinstein *et. al* (2005) [44] descreveram a adição dos reagentes na seguinte ordem: solução tampão, suspensão membranar, KCN, MenaQ ou Q1, e por fim NADH, dando assim início à reação. Em ensaios onde foram adicionados compostos que inibem a atividade da NDH-2, estes eram adicionados antes do NADH.

Dado que foi necessário adaptar o método ao nosso sistema, também a ordem de adição dos reagentes sofreu algumas alterações. Neste sentido, a ordem de adição foi definida da seguinte forma: solução tampão (MOPS, pH 7,2), rotenona, KCN, suspensão membranar, NADH e por fim Q1, para iniciar a reação. Nos ensaios onde foram utilizados compostos com atividade antimicobacteriana, estes foram adicionados imediatamente a seguir ao KCN. Esta ordem permitiu que, aquando da adição das membranas, o meio reunisse todas as condições necessárias para inibir a cadeia respiratória, permitindo assim verificar que não existia oxidação do NADH antes da adição de Q1 e, deste modo, garantir uma monitorização de todos os ensaios realizados. Um exemplo de um dos ensaios de atividade da NDH-2 é apresentado pelo Figura 3.10.

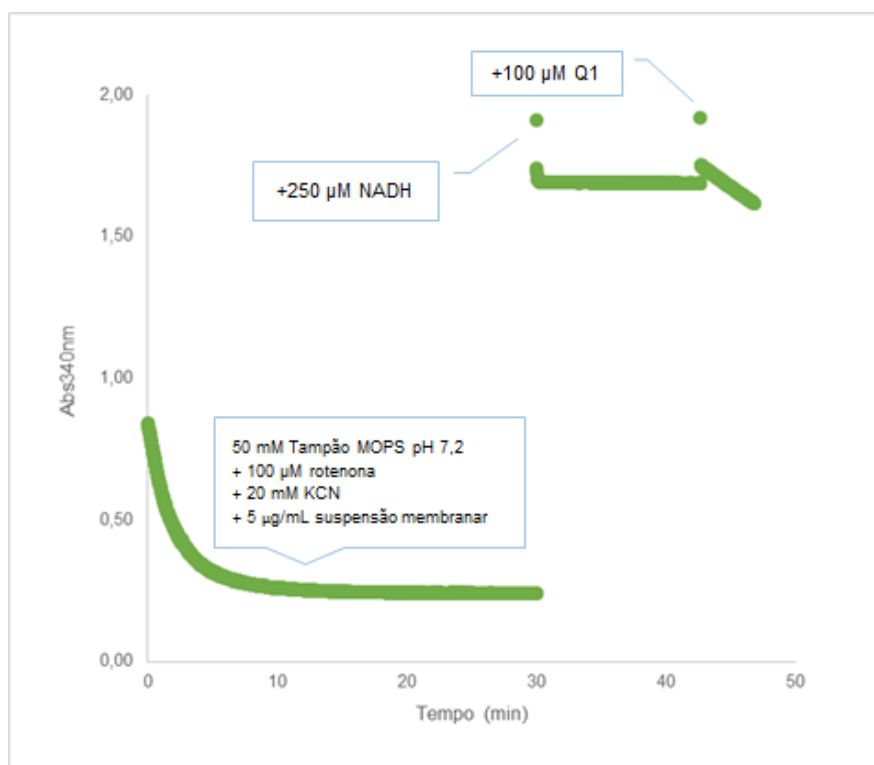
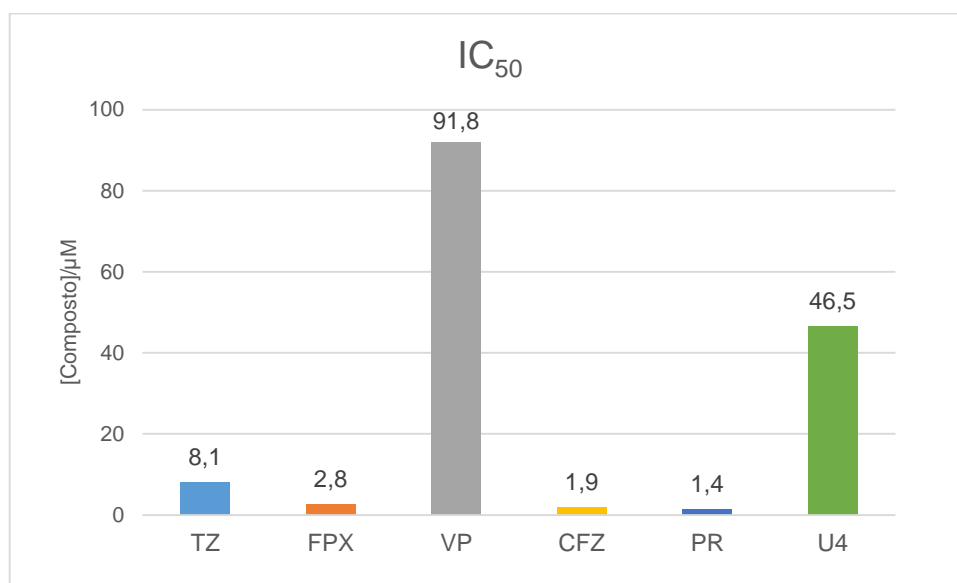


Figura 3.10 – Exemplo de um ensaio completo (variação da absorbância a 340 nm em função do tempo) a partir do qual é determinada a atividade da NDH-2 de *M. tuberculosis*.

### 3.2.2. Determinação do efeito inibitório da NDH-2 por compostos com atividade antimicobacteriana

#### 3.2.2.1. Determinação dos valores de concentração inibitória (IC<sub>50</sub>)

O valor de IC<sub>50</sub>, como já referido, é a concentração à qual um fármaco é capaz de inibir 50% da atividade de um dado processo biológico e quanto menor for este valor mais ativo é o composto. A partir dos resultados obtidos nos ensaios de atividade na presença de compostos com atividade antimicobacteriana, foi possível determinar este parâmetro para cada composto (Figura 3.11).



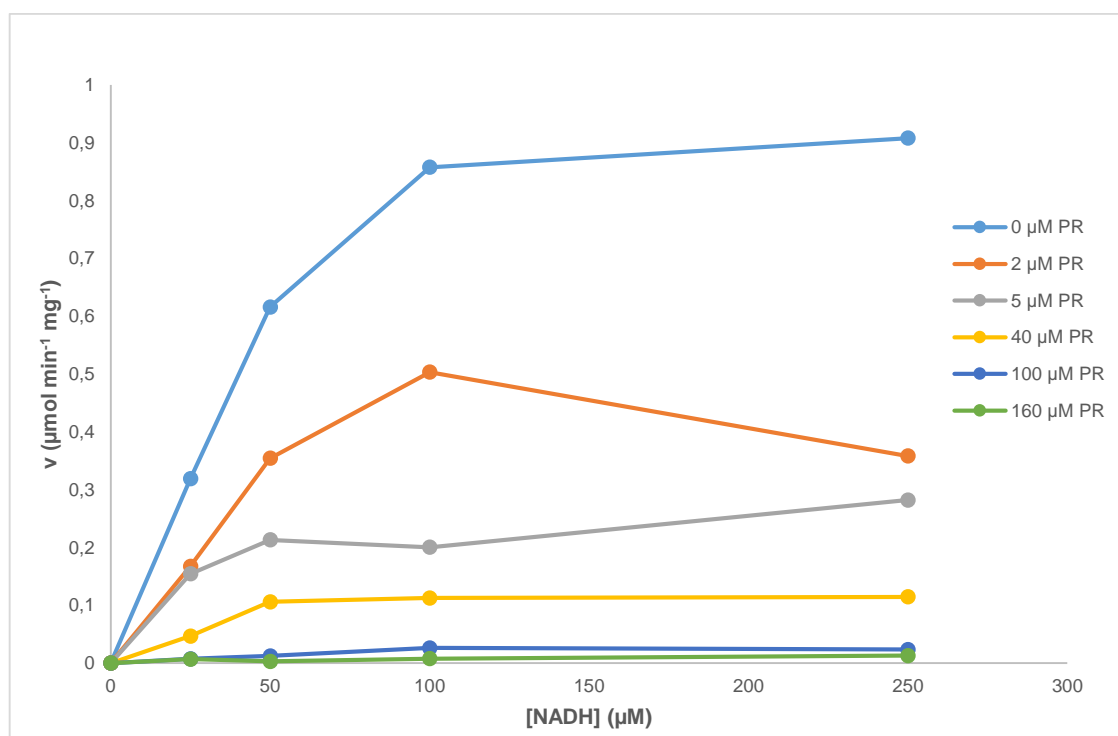
**Figura 3.11 – Valores de IC<sub>50</sub> (μM) dos compostos com atividade antimicobacteriana estudados.** Os valores de R<sup>2</sup> obtidos no *GraphPad Prism 5* foram os seguintes: TZ (0,945); FPX (0,998); VP (0,969); CFZ (0,874); PR (0,984) e U4 (0,880).

De um modo geral, os valores de IC<sub>50</sub> obtidos indicaram que todos os compostos utilizados inibiram a atividade da NDH-2. Os compostos que mostraram maior inibição desta enzima (menor valor de IC<sub>50</sub>), foram o PR, CFZ, FPX. Assim sendo, é necessária uma concentração mais baixa destes compostos para que seja inibida atividade da NDH-2. Estes dados sugerem que os compostos acima mencionados têm mais potencial terapêutico. Relativamente à TZ, o seu efeito inibitório é também significativo embora inferior comparativamente ao PR, CFZ e FPX. Por outro lado, os valores de IC<sub>50</sub> do U4 e VP mostraram que é necessária uma maior concentração dos mesmos para que a inibição da NDH-2 seja mais significativa.

Warman *et. al* (2013) [66] expressaram heterologicamente a NDH-2 de *M. tuberculosis* em *E.coli* e obtiveram valores de IC<sub>50</sub> de 28,6 μM e 11,4 μM para o FPX e para a TZ, respetivamente. Comparando estes valores com os obtidos neste estudo, verifica-se que, no caso da TZ (8,1 μM) os valores de IC<sub>50</sub> não são muito discrepantes. Contudo, o IC<sub>50</sub> obtido para o FPX (2,8 μM), é bastante menor do que o determinado por Warman *et. al* (2013) [66]. Esta discrepância nos valores de IC<sub>50</sub> pode dever-se a diferentes condições experimentais utilizadas em ambos os estudos, nomeadamente a concentração de KCN e a ausência do inibidor do complexo I.

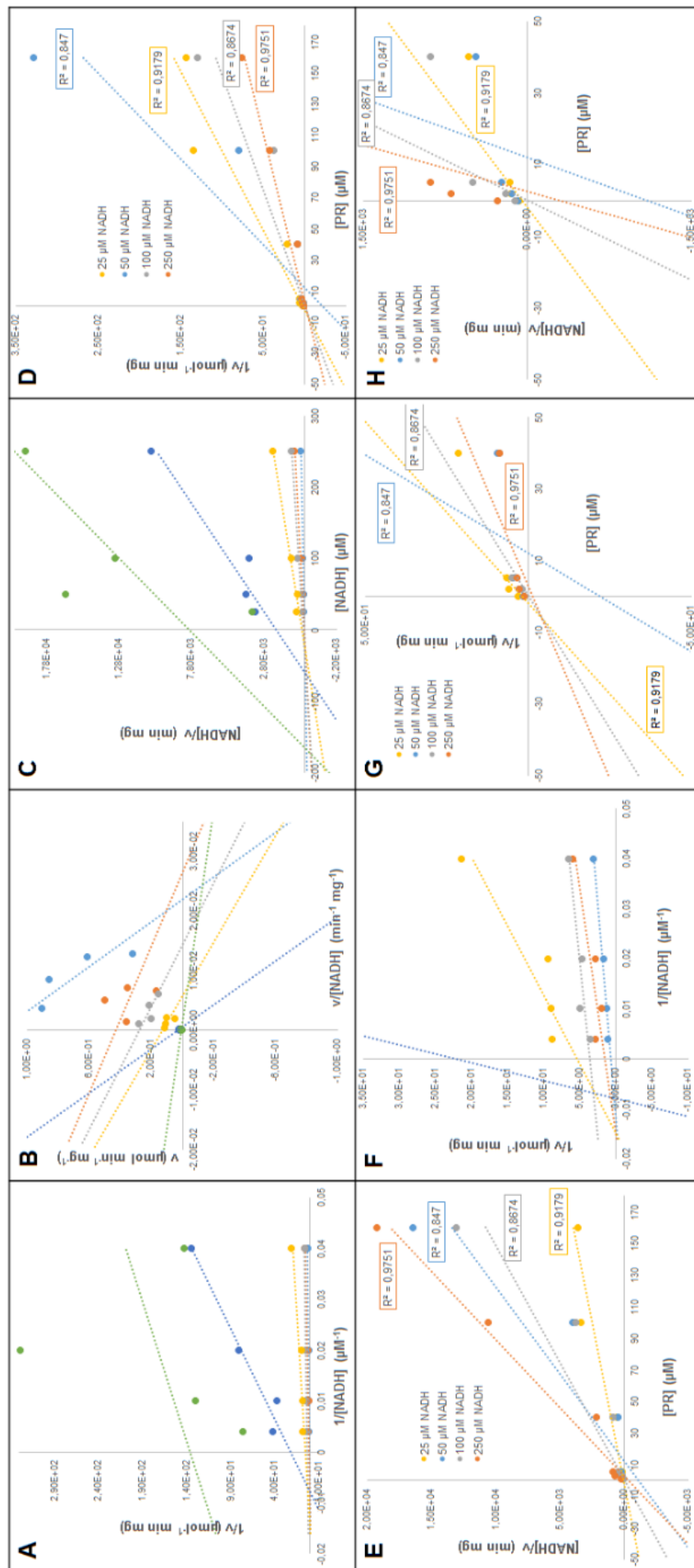
### 3.2.2.2. Determinação dos parâmetros cinéticos da NDH-2 na presença e ausência de PR

Dos compostos estudados, o PR foi aquele que apresentou um menor valor de  $IC_{50}$ , razão pela qual foi efetuado um estudo cinético mais detalhado onde foram testadas varias concentrações deste composto e do substrato NADH. A variação da atividade enzimática da NDH-2, em ambiente membranar, com a concentração de NADH e na presença de diferentes concentrações do composto antimicrobiano PR encontra-se indicada na Figura 3.12. De um modo geral, os valores de atividade aumentam com o aumento da concentração do substrato até ser atingida uma fase estacionária, tal como esperado. Da mesma forma, as atividades decrescem com o aumento da concentração de PR.



**Figura 3.12 – Variação da atividade da NDH-2 com a concentração do substrato NADH para diferentes concentrações de PR.**

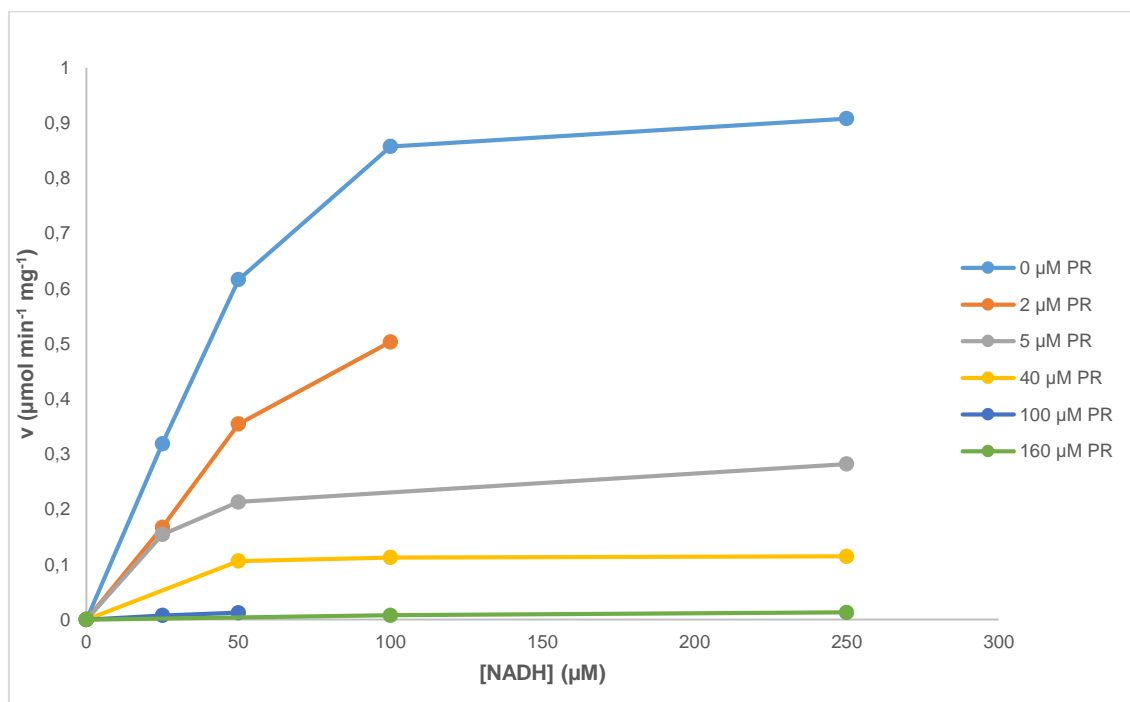
Com o objetivo de determinar os parâmetros cinéticos  $K_M$  e  $V_{\max}$  da NDH-2 relativos ao substrato NADH, bem como o valor de  $K_I$  e o tipo de inibição devida ao composto PR foram efetuadas as representações correspondentes às representações de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf, Dixon e Cornish-Bowden (Figura 3.13).



**Figura 3.13– Representações de Lineweaver-Burk (A) Eadie-Hofstee (B) Hanes-Woolf (C) Dixon (D) e Cornish-Bowden (E). Ampliações das zonas de interseção das retas para as representações de Lineweaver-Burke, Dixon e Cornish-Bowden encontram-se representadas nos painéis F, G e H, respectivamente. Nos painéis A, B, C e F as retas correspondem a: 0  $\mu\text{M}$  (azul claro), 2  $\mu\text{M}$  (laranja), 5  $\mu\text{M}$  (cinzento), 40  $\mu\text{M}$  (amarelo), 100  $\mu\text{M}$  (azul escuro) e 160  $\mu\text{M}$  (verde) de PR.**

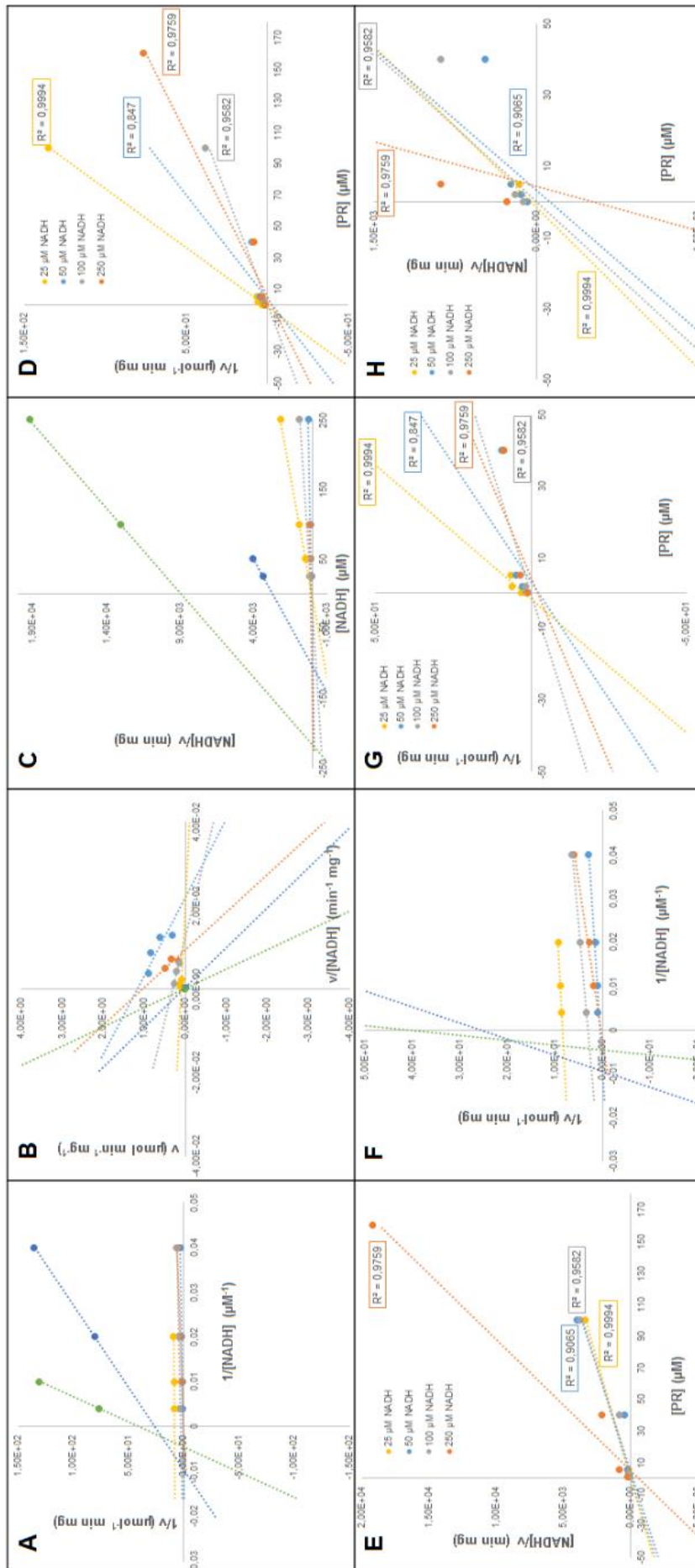
Da análise dos vários gráficos obtidos (Figura 3.13) não foi possível identificar nenhum tipo de inibição relativa ao PR (ver Tabelas A1 e A2, em Anexo 1).

Uma nova análise sem considerar os valores com comportamento anômalo foi efetuada (Figura 3.14).



**Figura 3.14 – Variação da atividade da NDH-2 com a concentração do substrato NADH para diferentes concentrações de PR, não considerando os pontos anômalos.** (Ver Figura 3.12).

A partir dos valores indicados na Figura 3.14 foram novamente efetuadas as representações correspondentes às representações de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf, Dixon e Cornish-Bowden (Figura 3.15).



**Figura 3.15 – Representações de Lineweaver-Burk (A) Eadie-Hofstee (B) Hanes-Woolf (C) Dixon (D) e Cornish-Bowden (E), não considerando os pontos anômalos.** Ampliações das zonas de interseção das retas para as representações de Lineweaver-Burk, Dixon e Cornish-Bowden encontram-se representadas nos painéis F, G e H, respectivamente. Nos painéis A, B, C e F as retas correspondem a: 0  $\mu\text{M}$  (azul claro), 2  $\mu\text{M}$  (laranja), 5  $\mu\text{M}$  (cinzento), 40  $\mu\text{M}$  (amarelo), 100  $\mu\text{M}$  (azul escuro) e 160  $\mu\text{M}$  (verde) de PR.

Apesar desta nova análise, continuou a não ser possível identificar de forma inequívoca o tipo de inibição e o valor de  $K_i$  para o PR relativamente ao substrato NADH. Na literatura encontram-se descritos estudo relativos ao tipo de inibição pela fenotiazina trifluoperazina (TPZ) [52]. Os resultados obtidos por estes autores demonstraram que a inibição pela TPZ é não-competitiva e incompetitiva para os substratos NADH e Q1, respetivamente. Relativamente ao composto PR, cuja estrutura não se encontra disponível por razões de confidencialidade, não é possível prever se o mesmo tipo de inibição observado para a TPZ seria expectável.

No entanto, a partir dos ensaios efetuados na ausência de inibidor foi possível determinar o valor de  $V_{\max}$  e  $K_M$  para a NDH-2 em ambiente membranar (Tabela 3.3).

**Tabela 3.3 – Valores de  $V_{\max}$  e  $K_M$  para a NDH-2 em ambiente membranar.**

Linearização	$V_{\max}$ ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )
Lineweaver-Burk	1,5	88,2
Eadie-Hofstee	1,2	53,3
Hanes-Woolf	1,1	44,2
<b>Média</b>	<b>1,3 <math>\pm</math> 0,2</b>	<b>61,9 <math>\pm</math> 23,2</b>

Os valores obtidos para estes dois parâmetros são similares aos determinados por Warman *et. al* (2013) [66] para a NDH-2 de *M. tuberculosis* sobreexpressa em *E. coli* ( $V_{\max} = 1,2 \pm 0,1 \mu\text{mol min}^{-1}$ ;  $K_M = 54,9 \pm 12,2 \mu\text{M}$ ).





## Capítulo 4 – Conclusões e Perspetivas Futuras

No trabalho experimental desenvolvido ao longo desta dissertação, foi avaliado o efeito de diversos compostos com atividade antimicobacteriana na atividade da NDH-2 de *M. tuberculosis*, com a finalidade de estudar a potencialidade desta enzima como um alvo terapêutico no combate da tuberculose. Para tal, foram realizados ensaios de atividade, nos quais foi necessário efetuar uma adaptação da técnica, descrita por Weinstein *et al.* (2005) [44], ao nosso sistema de membranas. Esta otimização foi atingida com sucesso, dado que foi possível inibir o complexo I e os citocromos oxigénio redutases pela ação conjunta do KCN e rotenona, permitindo garantir que a atividade observada durante os ensaios enzimáticos era exclusivamente da NDH-2.

Os resultados obtidos neste estudo dos compostos com atividade antimicobacteriana mostraram que todos os compostos utilizados inibem a atividade da NDH-2. PR, CFZ, FPX e TZ mostraram ser os mais promissores, apresentando valores de  $IC_{50}$  de 1,4  $\mu M$ , 1,9  $\mu M$ , 2,8  $\mu M$  e 8,1  $\mu M$ , respetivamente. Por outro lado, os restantes compostos, U4 e VP com valores de 46,5  $\mu M$  e 91,8  $\mu M$ , respetivamente, também inibem a NDH-2, contudo é necessária uma maior concentração para que tal se verifique. De todos os compostos é de destacar o PR, que devido ao seu baixo valor de  $IC_{50}$ , pode ser uma boa aposta para a produção de um fármaco com ação antimicobacteriana ou adjuvante dos antibióticos já existentes para tratar infeções multirresistentes de micobactérias.

Face à potencialidade do PR foi efetuado um estudo cinético mais detalhado variando a concentração deste composto e do substrato NADH. Contudo, os dados obtidos não permitiram identificar de forma inequívoca o tipo de inibição do PR relativamente o NADH.

Os valores de  $V_{max}$  (1,3  $\mu mol\ min^{-1}$ ) e de  $K_M$  (61,9  $\mu M$ ) da NDH-2 em ambiente membranar, são concordantes com valores descritos na literatura o que reforça a metodologia experimental utilizada na determinação de atividades enzimáticas.

Desta forma em termos futuros, será necessário caracterizar melhor o tipo de inibição do PR com a finalidade de obter os restantes dados cinéticos relativos ao composto e, também, completar o estudo com mais concentrações de substrato. Como a NDH-2 têm dois substratos, seria também necessário reproduzir este estudo para o outro substrato, Q1, e identificar os parâmetros cinéticos e o tipo de inibição do PR em relação a este.

Uma vez que ao longo deste trabalho foi estudada a NDH-2 em ambiente membranar, futuramente seria interessante purificar a enzima e realizar os ensaios de atividade aqui descritos com a enzima pura, com o objetivo de complementar a informação existente. Seria também interessante determinar a estrutura da NDH-2 com e sem inibidores.



## Bibliografia

- [1] V. Kumar, A. Abbas e R. Mitchell, *Robbins Basic Pathology*, 8th ed. Elsevier, 2007.
- [2] R. Garcia, S. Cecatto, R. Mendonça, C. Barcelos, R. Santos e P. Rapoport, "Tuberculosis and blastomycosis o the larinx: report of three cases and review o the literature," *Rev Bras Otorrinolaringol*, vol. 70, no. 2, 2004.
- [3] T. Martins, S. Miranda, C. Salvado, M. Alberto, F. Correia, P. Gonçalves e R. Proença, "Tuberculose óssea - o ressurgir de velhas formas de apresentação," *Med. Interna (Bucur)*, vol. 3, no. 2, 1996.
- [4] WHO, "World Health Organization - Tuberculosis," *World Health Organization*. [Online]. Available: <http://www.who.int/topics/tuberculosis/en/>.
- [5] CDC, "The Difference Between Latent TB Infection and Active TB Disease," *CDC*, 2011.
- [6] CDC, "Basic TB Facts," *CDC*. [Online]. Available: <http://www.cdc.gov/tb/topic/basics/default.htm>. [Accessed: 22-Sep-2014].
- [7] WHO, "Global Tuberculosis Report 2014," *World Heal. Organ.*, 2014.
- [8] L. Wayne e G. Kubica, "Family Mycobacteriaceae: Genus *Mycobacterium*," in *Bergey's manual of systematic bacteriology VolIII*, L. Wayne and G. Kubica, Eds. New York, 1986, pp. 1436–1457.
- [9] A. Koul, E. Arnoult, N. Lounis, J. Guillemont e K. Andries, "The challenge of new drug discovery for tuberculosis," *Nature*, vol. 469, no. 7331, pp. 483–90, 2011.
- [10] E. Tortoli, "The new mycobacteria: an update," *FEMS Immunol Med Microbiol*, vol. 48, pp. 159–178, 2003.
- [11] K. Ryan e C. Ray, Eds., *Sherrie Medical Microbiology*, 4th ed. McGraw Hill, 2004.
- [12] S. Bhamidi, "Mycobacterial Cell Wall Arabinoglactan," in *Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends*, Caister Academic Press, 2009.
- [13] J. Ghosh, P. Larsson, B. Singh, B. Pettersson, N. Islam, S. Sarkar, S. Dasgupta e L. Kirsebom, "Sporulation in Mycobacteria," *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, vol. 106, no. 26, pp. 10781–10786, 2009.
- [14] M. Forrelland, L. Klepp, A. Gioffré, J. Sabio y García, H. Morbidoni, M. de la Paz Santangelo, A. Cataldi e F. Bigi, "Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex," *Virulence*, vol. 4, no. 1, pp. 3–66, 2013.
- [15] D. Van Soolingen, T. Hoogenboezem e P. de Haas, "Characterization of an exceptional isolate from Africa," *Int J Syst. Evol Microbiol*, vol. 47, pp. 1236–1245, 1997.

- [16] D. Cousins, R. Bastida e A. Cataldi, "Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp.," *Int J Syst. Evol Microbiol*, vol. 53, pp. 1305–1314, 2003.
- [17] A. Aranaz, D. Cousins e A. Mateos, "Elevation *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* to species rank as *Mycobacterium caprae* cmb. nov.," *Int J Syst. Evol Microbiol*, vol. 53, pp. 1785–1789, 2003.
- [18] J. Grange, O. Bottasso, C. Stanford e J. Stanford, "The use of mycobacterial adjuvant-based agents for immunotherapy of cancer," *Vaccine*, vol. 26, no. 39, pp. 4984–4990, 2008.
- [19] P. Murray, K. Rosenthal e M. Pealler, "*Mycobacterium*," in *Medical Microbiology*, 5th ed., Elsevier Mosby, 2006, pp. 289–302.
- [20] E. Bell, "Vaccines: A souped-up version of BCG," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 5, no. 10, p. 746, 2005.
- [21] F. Mann, M. Xu, X. Chen, D. Fulton, D. Russel e R. Peters, "Edaxadiene: A New Bioactive Diterpene from *Mycobacterium tuberculosis*," *Jounal Am. Chem. Soc.*, vol. 131, no. 48, pp. 17526–17527, 2009.
- [22] J. Flynn e J. Chan, "Immune evasion *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy," *Curr Opin Immunol*, vol. 15, no. 4, pp. 450–455, 2003.
- [23] M. Viveiros, C. Leandro e L. Amaral, "Mycobacterial efflux pumps and chemotherapeutic implications," *Int J Antimicrob*, vol. 22, no. 3, pp. 274–278, 2003.
- [24] P. da Silva, A. Von Groll, A. Martin e J. Palomino, "Efflux as a meechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*," *FEMS Immunol Med Microbiol*, vol. 63, no. 1, pp. 1–9, 2011.
- [25] J. Pasipanodya e T. Gumbo, "A new evolutionary and pharmacokinetic-pharmacodynamic scenario for rapid emergence of resistance to single and multiple anti-tuberculosis drugs," *Curr Opin Pharmacol*, vol. 11, no. 5, pp. 457–463, 2011.
- [26] M. Viveiros, M. Martins, I. Couto e D. Machado, "Molecular tools for rapid identification and novel effective therapy against MDRTB / XDRTB infections," vol. 2006, pp. 465–480, 2010.
- [27] M. Niederweis, O. Danilchanka, J. Huff, C. Hoffmann e H. Engelhart, "Mycobacterial outer membranes: in search of proteins," *Trends Microbiol*, vol. 18, no. 3, pp. 109–116, 2010.
- [28] L. Nguyen e C. Thompson, "Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: the mycobacterial paradigm," *Trends Microbiol*, vol. 14, no. 7, pp. 304–312, 2006.
- [29] M. Viveiros, M. Martins, L. Rodrigues, D. Machado, I. Couto, J. Ainsa e L. Amaral, "Inhibitors of mycobacterial efflux pumps as potential boosters for anti-tubercular drugs," *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, vol. 10, no. 9, pp. 983–998, 2012.
- [30] T. Cox e J. Firth, Eds., *Oxford Texbook of Medicine*. Oxford, 2003.
- [31] C. Peloquin, "Clinical pharmacology of the anti-tuberculosis drugs," in *Clinical Tuberculosis*, 4th ed., London: Hodder and Stoughton Ltd, 2014, pp. 171–190.

- [32] D. Bald e A. Koul, "Respiratory ATP synthesis: the new generation of mycobacterial drug targets?," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 308, no. 1, pp. 1–7, 2010.
- [33] G. Kaim e P. Dimroth, "ATP synthesis by F-type ATP-synthase is obligatory dependent on the transmembrane voltage," *EMBO J.*, vol. 18, no. 15, pp. 4118–4127, 1999.
- [34] P. Turina, A. Rebecchi, M. D'Alessandro, S. Anefors e B. Melandri, "Modulation of proton pumping efficiency in bacterial ATP synthases," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1757, pp. 320–325, 2006.
- [35] P. Friedl, J. Hoppe, R. Gunsalus, O. Michelsen, K. Von Meyenburg e H. Schairer, "Membrane integration and function of the three F<sub>0</sub> subunits of the ATP synthase of *Escherichia coli* K12," *EMBO J.*, vol. 2, pp. 99–103, 1983.
- [36] M. Santana, M. Lonescu, A. Vertes, R. Longin, F. Kunst, A. Danchin e P. Glaser, "*Bacillus subtilis* F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPase: DNA sequence of the atp operon and characterization of the atp mutants," *J Bacteriol*, vol. 176, pp. 6802–6811, 1994.
- [37] S. Tran e G. Cook, "The F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase of *Mycobacterium smegmatis* is essential for growth," *J Bacteriol*, vol. 187, pp. 5023–5028, 2005.
- [38] L. Shi, C. Sohaskey, B. Kana, S. Dawes, R. North, V. Mizrahi e M. Gennaro, "Changes in energy metabolism of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse lung and under in vitro conditions affecting aerobic respiration," *P Natl Acad Sci USA*, vol. 102, pp. 15629–15634, 2005.
- [39] S. Rao, S. Alonso, L. Rand, T. Dick e K. Pethe, "The protonmotive force is required for maintaining ATP homeostasis and viability of hypoxic, nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 33, pp. 11945–50, 2008.
- [40] C. Sassetti, D. Boyd e E. Rubin, "Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis," *Mol Microbiol*, vol. 48, pp. 77–84, 2003.
- [41] J. Knuuti, G. Belevich, V. Shama, D. Bloch e M. Verkhovskaya, "A single amino acid residue controls ROS production in the respiratory Complex I from *Escherichia coli*," *Mol Microbiol*, vol. 90, pp. 119–1200, 2013.
- [42] L. Miesel, T. Weisbrod, J. Marcinkeviciene, R. Bittman e W. Jacobs, "NADH Dehydrogenase Defects Confer Isoniazid Resistance and Conditional Lethality in *Mycobacterium smegmatis*," vol. 180, no. 9, pp. 2459–2467, 1998.
- [43] A. Melo, T. Bandejas e M. Teixeira, "New Insights into Type II NAD ( P ) H: Quinone Oxidoreductases," vol. 68, no. 4, 2004.
- [44] E. Weinstein, T. Yano, L. Li, D. Avarbock, A. Avarbock, D. Helm, A. McColm, K. Duncan, J. T. Lonsdale e H. Rubin, "Inhibitors of type II NADH:menaquinone oxidoreductase represent a class of antitubercular drugs," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 12, pp. 4548–53, 2005.
- [45] R. Cox e G. Cook, "Growth regulation in the mycobacterial cell," *Curr Mol Med*, vol. 7, pp. 231–245, 2007.

- [46] L. Matsoso, B. Kana, P. Crellin, D. Lea-Smith, A. Pelosi, D. Powell, S. Dawes, H. Rubin, R. Coppel e V. Mizrahi, "Function of cytochrome bc1-aa3 branch of the respiratory network in mycobacteria and network adaptation occurring in response to its disruption," *J Bacteriol*, vol. 187, pp. 6300–6308, 2005.
- [47] A. Niebisch e M. Bott, "Purification of a cytochrome bc-aa3 supercomplex with quinol oxidase activity from *Corynebacterium glutamicum*. Identification of a fourth subunit of cytochrome aa3 oxidase and mutation analysis of diheme cytochrome c1," *J Biol Chem*, vol. 278, pp. 4339–4346, 2003.
- [48] B. Kana, E. Weinstein, D. Avarbock, S. Dawes, H. Rubin e V. Mizrahi, "Characterization of the cydAB-encoded cytochrome bd oxidase from *Mycobacterium smegmatis*," *J Bacteriol*, vol. 183, pp. 7076–7086, 2001.
- [49] J. Teh, T. Yano e H. Rubin, "Type II NADH: menaquinone oxidoreductase of *Mycobacterium tuberculosis*," *Infect. Disord. - Drug Targets*, vol. 7, no. 2, pp. 169–181, 2007.
- [50] A. Heikal, Y. Nakatani, E. Dunn, M. Weimar, C. Day, E. Baker, J. Lott, L. Sazanov e G. Cook, "Structure of the bacterial type II NADH dehydrogenase: a monotopic membrane protein with an essential role in energy generation.," *Mol. Microbiol.*, vol. 91, no. 5, pp. 950–64, 2014.
- [51] A. Escherman, A. Galkin, W. Oettmeir, U. Brandt e S. Kersher, "HDQ (1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone), a high affinity inhibitor for mitochondrial alternative NADH dehydrogenase," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, pp. 3138–3142, 2005.
- [52] T. Yano, L. Li, E. Weinstein, J. Teh e H. Rubin, "Steady-state kinetics and inhibitory action of antitubercular phenothiazines on *Mycobacterium tuberculosis* type-II NADH-menaquinone oxidoreductase (NDH-2).," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 17, pp. 11456–63, 2006.
- [53] T. Yamashita, E. Nakamaru-Ogiso, H. Miyoshi, A. Matsuno-Yagi e T. Yagi, "Roles of bound quinone in the single subunit NADH-quinone oxidoreductase (Ndi1) from *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 9, pp. 6012–6020, 2007.
- [54] Y. Yang, T. Yamashita, E. Nakamaru-Ogiso, T. Hashimoto, M. Murai, J. Igarashi, H. Miyoshi, N. Mori, A. Matsuno-Yagi, T. Yagi e H. Kosaka, "Reaction mechanism of single subunit NADH-ubiquinone oxidoreductase (Ndi1) from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for a ternary complex mechanism," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 11, pp. 9287–9297, 2011.
- [55] T. Catarino, "Enzimologia. Reações enzimáticas com dois ou mais substratos." pp. 1–21, 2014.
- [56] A. Shvartsburd, V. Nwokeafor, e R. Smith, "Red blood cell and plasma levels of thioridazine and mesoridazine in schizophrenic patients," *Psychopharmacology (Berl)*, vol. 82, no. 1–2, pp. 55–61, 1984.
- [57] E. De Rossi, J. Aínsa e G. Riccardi, "Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unsolved question," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 30, no. 1, pp. 36–52, 2006.
- [58] X. Shen, J. Xia e C. Adams, "Flupenthixol versus placebo for schizophrenia," *Cochrane Database Syst Rev*, vol. 11, 2012.
- [59] J. Arbiser e S. Moschella, "Clofazimine: a review of its medical uses and mechanisms of action," *J Am Acad Dermatol*, vol. 32, no. 2, pp. 241–247, 1995.

- [60] N. Morrison e G. Marley, "Clofazimine binding studies with deoxyribonucleic acid," *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, vol. 44, no. 4, pp. 475–481, 1997.
- [61] V. Kagan, "Tocopherol stabilizes membrane against phospholipase A, free fatty acids, and lysophospholipids," *Ann. New York Acad. Sci.*, vol. 507, pp. 121–135, 1989.
- [62] W. Bellamy, "P-glycoproteins and multidrug resistance," *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, vol. 36, pp. 161–183, 1996.
- [63] M. Blokpoel, H. Murphy, R. O'Toole, S. Wiles, E. Runn, G. Stewart, D. Young e B. Robertson, "Tetracycline-inducible gene regulation in mycobacteria," *Nucl Acid Res*, vol. 33, no. 2, p. e22, 2005.
- [64] U. Laemmli, "Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4," *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, 1970.
- [65] J. Svasti e B. Panijpan, "SDS-polyacrilamide gel electrophoresis. A simple explanation of why it works," *J. Chem. Educ.*, vol. 54, no. 9, p. 560, 1977.
- [66] A. Warman, T. Rito, N. Fisher, D. Moss, N. Berry, P. O'Neill, S. Ward e G. Biagini, "Antitubercular pharmacodynamics of phenothiazines," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 68, no. 4, pp. 869–880, 2013.
- [67] N. Fisher, A. J. Warman, S. Ward e G. Biagini, *Chapter 17 Type II NADH: quinone oxidoreductases of Plasmodium falciparum and Mycobacterium tuberculosis kinetic and high-throughput assays.*, 1st ed., vol. 456, no. 08. Elsevier Inc., 2009.
- [68] D. Nelson e M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3rd ed. New York: Worth Publishers, 2000.
- [69] H. Weiner, "Enzymes: Classification, Kinetic, and Control," in *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, 6th ed., T. M. Devlin, Ed. 2006, pp. 366–410.
- [70] A. Cornish-Bowden, "Irreversible Inhibitors," in *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, 4th ed., Wiley-Blackwell, 2012, pp. 194–195.
- [71] P. Black, R. Warren, G. Louw, P. van Helden, T. Victor e B. Kana, "Energy metabolism and drug efflux in *Mycobacterium tuberculosis*," *Am. Soc. Microbiol.*, vol. 58, no. 5, pp. 2491–2503, 2014.
- [72] A. Cornish-Bowden, "A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors," *Biochem. J.*, vol. 137, pp. 143–144, 1974.





## Anexo 1

**Tabela A1 – Classificação do tipo de inibição através do perfil das linearizações de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee e Hanes-Woolf. Adaptado de Catarino T, 2014 [55].**

Tipo de inibição	Representação Lineweaver-Burk ( $1/v = f(1/[S])$ )	Representação de Eadie-Hofstee ( $v = f(v/[S])$ )	Representação de Hanes-Woolf ( $[S]/v = f([S])$ )
Competitiva pura ( $\alpha = \infty, \beta = 1$ )			
Não competitiva pura ( $\alpha = 1, \beta = 0$ )			
Incompetitiva pura ( $\alpha < 1, \beta = 0, K_i \gg S$ )			
Competitiva parcial ( $1 < \alpha < \infty, \beta = 1$ )			
Não competitiva parcial ( $\alpha = 1, 0 < \beta < 1$ )			
Incompetitiva parcial hiperbólica ( $0 < \alpha < 1, 0 < \beta < 1, \alpha \neq \beta$ )			
Não competitiva pura/competitiva parcial ( $1 < \alpha < \infty, \beta = 0$ )			
Mista não competitiva/incompetitiva ( $\alpha < 1, \beta = 0$ )			
Mista hiperbólica ( $0 < \alpha < 1, 0 < \beta < 1, \alpha \neq \beta$ )			
Mista hiperbólica ( $0 < \alpha < 1, 0 < \beta < 1, \alpha \neq \beta$ )			
Mista hiperbólica (parcial) ( $1 < \alpha < \infty, 0 < \beta < 1$ )			

**Tabela A2 – Classificação do tipo de inibição através do perfil dos gráficos de Dixon e Cornish-Bowden.** Adaptado de Cornish-Bowden A, 1974 [72].

